

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine: Science de la nature et de la vie
Spécialité : Science biologique
Option: Biologie moléculaire des procaryotes
Département: Biologie

Thème

Les infections nosocomiales à bactéries multi- résistantes

Présenté par :

Menidjel Nadia

Devant la commission composée de :

Athamnia.M (MAB)	Président	Université de Guelma
Khallef .M (MCB)	Encadreur	Université de Guelma
Drif .F (MCB)	Examinatrice	Université de Guelma
Grara .N (MCA)	Membre	Université de Guelma
Khanaka .K (MAA)	Membre	Université de Guelma
Benbalgacem .S (MAA)	Membre	Université de Guelma

Juin 2017

SOMMAIRE

Remerciement.....	<i>i</i>
Dédicace.....	<i>ii</i>
Liste des abréviations.....	<i>iii</i>
Liste des figures.....	<i>iv</i>
Liste des tableaux.....	<i>v</i>
Introduction.....	1

Revue bibliographique

Chapitre I : L'environnement hospitalier et généralité sur les infections nosocomiales

I- L'environnement hospitalier.....	3
1- Définition.....	3
2-Eau.....	3
3-Air.....	3
4-Surfaces	4
II-Généralité sur les infections nosocomiales.....	5
1- Définition.....	5
2- Facteurs de risque infectieux.....	6
2-1-Services à haut risque.....	6
2-2- Facteurs liés aux malades	7
2-2-1-Les pathologies préexistantes.....	7
2-2-2-La pathologie à l'origine de l'hospitalisation.....	7
2-2-3-L'état nutritionnel non satisfaisant.....	7

2-3-4-L'âge.....	7
2-3- Facteurs liées aux techniques diagnostiques et thérapeutiques.....	7
2-3-1-Les actes invasifs.....	7
2-3-2-Le traitement chirurgical.....	8
2-3-3-Les traitements diminuant la résistance à l'infection.....	8
2-3-4- Les erreurs dans l'organisation des soins.....	8
2-4- Facteurs liées à l'environnement.....	9
3- Sources de germes à l'hôpital (Réservoir).....	9
3-1- Réservoir humain	9
3-2- Réservoir de l'environnement hospitalier	9
3-3-Réservoir animal	11
4- Modes de transmission.....	11
4-1-L'infection d'origine endogène :.....	11
4-1-1 Auto-infections.....	11
4-2-L'infection d'origine exogène	12
4-2-1- Hétéro –infections.....	12
4-2-2- Xéno- infections.....	12
4-2-3-Exo –infection.....	12
5-Surveillance et prévention contre les infections nosocomiales... ..	13
5-1-Surveillance	13
5-2-Prévention	13
Chapitre II : Les agents infectieux responsables des infections nosocomiales	
1- Virus.....	14
2-Parasites	16
3- champignons	16
4- Prions	17

5- Bactéries	17
5-1- Les bactéries commensales.....	17
5-2- Les bactéries pathogènes.....	17
5-3- Caractéristiques des bactéries nosocomiales.....	19

Chapitre III : La résistance bactérienne

1- Définition.....	20
2- Types de résistance	20
2-1.-Résistance naturelle	20
2-2-Résistance acquise	21
2-2-1-Résistances par mutation chromosomique.....	21
2-2-2-Résistances extra-chromosomique.....	21
2-2-3-Résistance croisée.....	21
2-2-4- Co-résistance.....	22
3-Mécanismes de Résistance	22
4- Facteurs contribuant à la résistance.....	22
5-Principaux bactéries multi résistantes.....	24

Partie pratique

Chapitre I : Matériel et méthodes

1 Objectif de l'étude	28
2-Prélèvement et enrichissement	28
2-1- Urine :.....	28
2-2-Pus	28
2-3- Surface sèche	28
2-4 – Air (atmosphère hospitalier)	28
3- Isolement	30
3-1-Urine	30
3-2- Pus	30
3-3- Surface sèche	30
3-4- Air	30
4-Identification :.....	31
4-1-Identification macroscopique	31
4-2- Identification microscopique	31

4 -2- 1- Examen direct à l'état frais	31
4-2-2- Examen direct après coloration	31
4-3- Identification biochimique	33
4-3-1-Caractères biochimiques des entérobactéries	33
4-3-2-Caractères biochimiques des <i>Pseudomonas</i>	35
4-3-3- Caractères biochimique des Staphylocoques	37
5- Antibiogramme	39
6- Test complémentaire...	42
6-1- Test de détection du SARM.....	42
6-2- Test double disque (test de synergie)	43

Chapitre II : Résultats et discussion

1- Urine(ECBU).....	44
1-1-Observation avant culture	44
1-1-1- Macroscopique	44
1-2-1-Microscopique (la cytologie).....	44
1-2-Observation après culture :.....	45
1-2-1-Macroscopique	45
1-2-2- Microscopique :.....	47
1-3-Résultats de l'identification :...	47
1-3-1-entérobactéries	47
1-3-2- non entérobactéries	49
1-3-3- Milieux sélectifs des <i>Pseudomonas</i>	49
1-4- Résultats de l'antibiogramme	49
2- Pus	53
2-1-Observation avant culture :.....	53
2-2-1-Examen microscopique à la coloration de bleu de méthylène	53
2-2-Observation après culture	53
2-2-1- Macroscopique	53
2-2-2-Microscopique.....	55
2-3-Résultats de l'identification	55

2-4-Résultats de l'antibiogramme	57
3- Surface sèche	58
3-1-Observation après culture :.....	58
3-1-1-Macroscopique	58
3-1-2- Microscopique	59
3-2-Résultats de l'identification	59
3-3- Résultats de l'antibiogramme	61
4-Air :.....	64
4-1- Observation après culture.....	64
4-1-1Macroscopique	64
5- Discussion.....	65
Conclusion.....	68
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Annexes	
Références bibliographiques	

Remerciements

*Je remercie ALLAH tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté
pour la réalisation de ce travail.*

*Je voudrie présenter mes remerciements et gratitude en premier lieu au laboratoire
De microbiologie et les services d'hospitalisations de l'EPH IBN ZOHR pour son
acceptation afin de réaliser ce travail.*

*Je tiens particulièrement à remercier ma promotrice et directrice de mémoire madame
«Khallef Messouda » Maitre de confirence en biologie pour avoir accepté la charge
de m'encadrer*

*je remercie également :Monsieur « Athamnia .M »
pour l'honneur qu'il nous a fait en présidant ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de
notre profond respect.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à Mde « Drif .F » pour avoir accepté
d'examiner et juger ce travail
Sans oublier aussi tout les membres de jury présents dans l'évaluation de ce travail :
Mde Grara .N , Mde Khanaka .K et Mde Benbelkacem . S*

*Je remercie également tout le personnel de laboratoire de microbiologie pour leur
accueil et leur contribution dans ce travail.*

Merci

*À ceux et celles qui m'a aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans mon
travail , je les remercie du fond du cœur.*

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de mon père,

Qu'il puisse reposer en paix

*A ma douce et tendre mère, le symbole de la tendresse, du courage, de la responsabilité et de
l'amour.*

En témoignage de ses prières, sa bénédiction, sa patience et ses sacrifices.

Que Dieux te garde, te comble de santé, et te donne longue vie.

A ma petite famille surtout mon mari Ahmed pour son aide et tout ce qu'il a fait

Ames enfants : Manar , Anes et Chouaib.

A mes chers frères Mohammed, Alla et Abdou , ma fierté dans cette vie.

Ames tendre, gentilles et adorables sœurs Souad, Fatima, Meryem et Ghada

*Ames chères cousines Wassila , Malika et Bassma en témoignage de
mes plus profondes amitiés.*

Ames chères tantes à qui j'exprime mes plus profonds sentiments d'amour.

Ames chères amies, Meryem, Imèn, Amina et Zahra

Je les remercie pour le sourire qu'elles ont su toujours dessiner sur mon visage.

Atout le personnel de laboratoire de microbiologie IBN ZOHR GUELMA.

A la Biologiste du labo « Meryem » pour son aide et sa patience

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

% : Pourcent

°C : Degré Celsius

ABR : *Acinetobacter baumannii* résistant

AK : Amikacine

AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique

AMp : Ampicilline

API 20E : Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)

API 20NE : Analytical profile index 20 Non Entérobactéries

ATB : Antibiotique

BGN : Bacille à Gram négatif

BGNf : Bacille Gram négatif fermentaire

BGNnf : Bacille à Gram négatif non fermentaire

BLSE : β -lactamase à spectre élargi

BMR : Bactérie multi résistante

BHIB : Bouillon Glucose Tamponé

BGT : Bouillon Cœur-Cervelle

C1G : Céphalosporines de 1ère génération

CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CAZ: Ceftazidime

CIP: Ciprofloxacine

CLIN : comité de lutte contre les infections nosocomiales.

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CRO: Ceftriaxone

CTX: Céfotaxime

CSI: colistine

CZ : Cefazoline

DO: Doxycycline

E : Erytromycine

EBLSE : Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi

EBCASE : Entérobactéries productrices de céphalosporinases

E. coli : *Escherichia coli*

EPH : Etablissement public hospitalier

ERV : *Enterococcus* résistants à la vancomycine

Etp : Ertapeneme

FQ : Fluoroquinolone

FOX: Céfoxitine

FSF: Fosfomycine

CHAP : Gelose chapman

g :Gramme

GLU : Glucose

GN : Gelose nutritif

Gmn: Gentamicine

GSC :Gélose au sang cuit

GSF : Gélose au sang frais

H : heure

HIV :Virus d'immunodéficience humaine

I: Intermédiaire

IN: Infection Nosocomiale

IND : Indole

IPM : Imipénème

IV :Intra veineuse

K.E.S : Groupe de *Klebsiella* ,*Enterbacter* ,*Serratia*

Kl .p :*Klebsiella pneumoniae*

Kmn: Kanamycine

L : lincomicine

MC : Gélose Mac Conkey

MF : Mac Farland

MH : Mueller Hinton

mm : millimètre

NET: Nétilmicine

OXA: Oxacilline

PPM : Groupe de *Proteus*, *Providencia* ,*Morganella*

R: Résistant

S : Sensible

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

T° :Température

Tcc: Ticarcilline + Acide clavulanique

Tic: Ticarcilline

Tmn : Tobramucine

UFC : Unités formant colonie

UV : ultra violet

URE : Uréase

VP: Voges Proskauer

μ : micro

μg : microgramme

μl : microlitre

Liste des figures (partie théorique) :

N° de figure	Titre	Page
01	Les différents modes de transmission des infections nosocomiales	11
02	Schéma de différentes sources d'infection nosocomiales virales	14
03	Mécanisme de résistance	23
04	Les différents mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques	23

Liste des figures (partie pratique) :

N° de figure	Titre	Page
01	Le protocole suivi pour l'étude bactérienne des différents prélèvements	29
02	Photo d'un logiciel API Web installé au niveau de laboratoire	41
03	Réalisation de l'antibiogramme avec distributeur	41
04	Distribution des antibiotiques dans la boîte MH	41
05	Photo d'un logiciel whonet 5,3 installé au niveau de laboratoire	41
06	Aspect microscopique des urines	46
07	Aspect macroscopique des souches entérobactéries sur GN	46
08	Aspect macroscopique des souches entérobactéries et non entérobactéries sur MC	46
09	Aspect macroscopique du <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur GN	46
10	Aspect microscopique des bacilles Gram négatif BGN	48
11	Aspect microscopique des coccobacilles Gram négatif	48
12	Test oxydase négatif pour BGN fermentaire	48
13	Test oxydase + pour les BGN non fermentaire	48
14	Identification des entérobactéries BGNf avec le système API20E (souches des urines)	48
15	Résultat de l'identification avec le système APINE pour les EBGNf (souche 5, 9 et 10 des urines)	50
16	Résultat de la culture des <i>Pseudomonas</i> à partir des prélèvements des urines 9 et 10 sur milieu King A et King B	50

17	Antibiogramme d' <i>Ecoli</i> avec image de synergie	52
18	Antibigramme d'un <i>Acinetobacter baumannii</i> BMR	52
19	Antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
20	Répartition selon la fréquence des bactéries multi résistantes isolés a partir des urines	53
21	Aspect microscopique de pus 1 et 2 avant culture (Coloration de bleu de méthylène)	54
22	Aspect macroscopique des colonies de Staphylocoques sur CHAP, GSC et GSF	54
23	Aspect microscopique des cocci Gram positif	56
24	Résultat du test catalase + pour les pus 1 et 3	56
25	Résultat du test coagulase + pour les <i>S. aureus</i> des pus 1 et 3	56
26	Résultat de l'identification avec le système d'API STAPH pour les Staphylocoque (pus 1 et 3)	56
27	Résultat positif pour la détection du SARM du pus 1 et 3	60
28	Répartition selon la fréquence des bactéries multirésistantes isolées a partir de l'ECB des pus	58
29	Résultat de l'identification avec système API 20 E pour les EBGN f (souches de surfaces)	60
30	Antibiogramme BGN f présente une image de synergie	62
31	Antibiogramme d'une <i>Kl . p</i> du site lit 15 ne présente pas l'image de synergie	62
32	Résultat de test de double disque (Test de synergie) pour <i>Kl . p</i> du site lit 15	62
33	Résultat de test double disque de confirmation de la présence de BLSE pour d'autres souches	62
34	Répartition des bactéries multirésistantes isolées a partir des surfaces selon leurs fréquences	63
35	Répartition de toutes les bactéries isolées selon leurs fréquences	63
36	Répartition des services selon la fréquence des bactéries	63
37	Répartition des bactéries selon leurs fréquences dans les services	64
38	Aspect macroscopique des colonies isolées a partir de l'air	64

Liste des tableaux (partie théorique) :

N° de tableau	Titre	Page
01	Zones à risque à l'hôpital	06
02	Taux d'infection pariétale en fonction du type de chirurgie	08
03	Principaux microorganisme pathogène responsable d'infection nosocomiale	18
04	Mécanisme de résistance	22
05	Facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques	24

Liste des tableaux (partie pratique) :

N° de tableau	Titre	Page
01	Les méthodes d'examen microscopique et leurs buts	32
02	Composition de la galerie biochimique classique	33
03	Caractéristiques des souches de Staphylocoque les plus fréquemment isolés	38
04	Aspect macroscopique des urines des malades hospitalisés	44
05	Aspect microscopique des urines	45
06	Aspect macroscopique des colonies a partir des urocultures sur GN et MC	45
07	Résultat de l'examen microscopique des différents urocultures	47
08	Résultat de la galerie biochimique API 20E (urine)	49
09	Résultat de la galerie biochimique APINE (urine)	49
10	Résultat de l'antibiogramme des germes isolés a partir des urines	51
11	Résultat de l'examen microscopique au bleu de méthylène	53
12	Aspect macroscopique des colonies après la culture des pus	55
13	Résultat de l'examen microscopique des pus	55
14	Résultat de la galerie biochimique API20E et API STAPH (pus)	57
15	Résultat de l'antibiogramme de l'ECB des pus	57
16	Aspect macroscopique des souches isolées au niveau des différents sites	59
17	Résultat de la galerie biochimique API20E (surface)	59
18	Résultat de l'antibiogramme des souches des souches isolées des surfaces	61

INTRODUCTION :

Le développement de la médecine est associé actuellement à l'apparition de nombreuses pathologies iatrogènes souvent liées à la difficulté d'améliorer simultanément la qualité de toutes les procédures de soins et d'entretien.

L'hôpital est considéré comme un écosystème pour les personnes affaiblies, traumatisées...C'est un lieu où l'on traite mais c'est également un lieu où l'on peut contracter un univers microbien et ainsi le risque de contracter des infections dites "Hospitalières" appelées également infections nosocomiales rançon du progrès en matière de techniques diagnostiques et thérapeutiques.

Le taux de ces infections « augmente » lorsque les malades sont exposés directement aux facteurs de l'environnement et aux actes médicaux. L'usage abusif des antibiotiques, l'état immunitaire des malades et le relâchement d'hygiène expliqueraient le fait qu'il soit difficile de prévenir certaines infections endogènes, ou autres infections dues à des bactéries opportunistes provenant de la flore bactérienne normale du malade.

Les IN constituent un important problème de santé publique par leurs conséquences humain, social et économique s'exprimant en terme pour lequel l'impact en matière de **morbidité** et de **surcoût** est aussi important, sinon plus, que celui en matière de **mortalité**. (Jarvis, 1996).

L'impact des IN dépend de l'état de base du patient, du site d'infection et du micro-organisme responsable. L'usage accru et l'abus d'antibiotiques contribuent au développement de germes hospitaliers multi-résistants posant des problèmes thérapeutiques grandissants.

Les germes résistants ont pour caractéristique de survivre assez durablement dans le milieu extérieur et d'être résistants à de nombreux antibiotiques éventuellement à certains antiseptiques, comme ils ont pu être responsables d'IN avec tendance épidémique

Dans cette intention, on s'est intéressé dans notre travail à la caractérisation phénotypique de souches bactériennes multi résistantes, isolées à partir du milieu hospitalier, Pour se faire, notre travail est divisé en 2 axes :

- Revue bibliographique destinée pour une étude théorique sur :

L'environnement hospitalier, généralité sur les IN, les agents infectieux responsables des IN et enfin la résistance bactérienne.

- Partie pratique basé sur :

L'isolement et l'identification des bactéries a partir de différents sites du milieu hospitalier et a partir d'autres prélèvements des patients hospitalisés responsables des IN, et par la suite une étude de la sensibilité aux antibiotiques est effectuée afin de cibler les souches multi résistantes.

I -L'environnement hospitalier :

1-Définition :

On regroupe habituellement sous le terme d'environnement hospitalier les éléments suivants: air, eau, surfaces (sols, murs, mobilier, équipement), linge, aliments, dispositifs médicaux, déchets. Ces éléments supportent de nombreux micro-organismes et cette contamination environnementale est très variable qualitativement et quantitativement d'un établissement à l'autre et au sein d'un même établissement en fonction des services, des patients (sains, colonisés, infectés), des soins et des techniques pratiqués (Debabza, 2015).

2-L'eau :

La consommation d'eau en milieu hospitalier est très importante, elle est estimée à 750 litres en moyenne par lit par jour avec des variations de 130 à 1300 litres , dont 40% est utilisée par le secteur de l'hospitalisation et le technique médicale et 60 % par les services généraux , à ce titre l'eau constitue l'une des préoccupations majeures de l'hygiène publique , et plus particulièrement dans le milieu hospitalier (Meyer *et al.*,2004).

Sur le plan microbiologique, l'eau sert comme un réservoir ou véhicule de certains microorganismes qui présentent un risque spécifique dans ce milieu, ce sont avant tout des bacilles à Gram négatif pour lesquels le milieu hydrique est un réservoir de choix (par exemple, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, etc).

A l'intérieur de l'établissement hospitalier ces micro-organismes en quantité faible peuvent proliférer aux niveaux des bras morts, des extrémités des canalisations, des brise-jets des robinets, des pommes de douche et dans les circuits d'eau chaude (Riou, 1993; Stout *et al.*,1997).

3-L'air :

L'air ambiant des locaux hospitaliers est un vecteur de transmission des microorganismes provenant des individus et d'une grande diversité de milieux de l'environnement hospitalier : eau, matériels, surfaces, textiles et fluides.

La flore microbienne de l'air est constituée d'une flore de base et d'une flore accidentelle :

- **La flore de base :** comprend des microorganismes saprophytes, les plus résistants aux agressions du milieu extérieur, elles provient essentiellement des milieux secs, elle est composée de bactéries (*Bacillus sp.et Pseudomonas sp.*), espèces apparentées (*Legionella sp.*), mycobactéries atypiques et champignons filamenteux (*Penicillium sp., Alternaria sp.*).(Avril *et al.*,1998)

-La flore accidentelle : est d'origine humaine et hydro tellurique, les microorganismes qui résistent dans le milieu extérieur sont considérés comme indicateur de contamination humaine (*Staphylococcus*, *Escherichia coli*). (Avril *et al.*, 1998)

Les micro-organismes de l'air sont généralement véhiculés par des supports de taille variable : poussière (10 à 100 µm), gouttelettes et microgouttelettes émises par les voies respiratoires humaines ou par aérosolisation (10 à 1000 µm) et noyaux de condensation (droplet nuclei) issus de l'évaporation des gouttelettes (2 à 5 µm). Les plus petites particules, de l'ordre du micron, persistent dans l'atmosphère de manière prolongée car leur vitesse théorique de chute est lente (environ 1 mètre en 8 heures) ; elles peuvent être maintenues en suspension et diffuser à distance de leur point d'émission et elles peuvent pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire et atteindre les alvéoles pulmonaires (Debabza, 2015)

4-Surfaces :

Les surfaces sont contaminées soit par contact, soit par sédimentation des micro-organismes présents dans l'air. La répartition de cette contamination des surfaces se fait le plus souvent de manière hétérogène. L'adhérence des bactéries est possible selon l'état de la surface et elle peut s'accompagner de la création d'un biofilm.

Du fait des conditions de croissance défavorables, certaines bactéries peuvent se miniaturiser (bactéries naines) et sont alors difficiles à mettre en évidence dans les prélèvements (bactéries viables et non cultivables). D'autres bactéries peuvent prendre une forme sporulée (*Clostridium difficile*). (Hajjar *et al.*, 2000).

Les surfaces les plus contaminées sont : le sol, les barrières de lit, les tables, les vêtements portés par les patients, les oreillers et les matelas (Boyce *et al.*, 1997).

Toutefois, toutes les espèces bactériennes isolées à partir de ces surfaces ne sont pas obligatoirement pathogènes mais la flore issue de l'activité humaine comme les bactéries de la flore cutanée ou des flores muqueuses et certaines espèces bactériennes des flores hydriques naturelles comme *Pseudomonas aeruginosa* peuvent être responsables des infections nosocomiales (Rouillon *et al.*, 2006).

II- Généralité sur les infections nosocomiales :

1-Définition :

Du grec *nosos* = maladie, *komein* = soigner, *nosokomeion* =hôpital.

Les infections nosocomiales, longtemps dénommées surinfections, infections hospitalières, infections acquises à l'hôpital, existent depuis la création des premières structures de soin. Une infection nosocomiale ou infection hospitalière. Peut être définie comme suit:

Infection acquise à l'hôpital par un patient admis pour une raison autre que cette infection [1].

Infection survenant chez un patient à l'hôpital ou dans un autre établissement de santé et chez qui cette infection n'était ni présente ni en incubation au moment de l'admission.

On appelle infection nosocomiale ou infection associée aux soins toutes les infections contractées pendant une hospitalisation et également pendant les soins délivrés en dehors des établissements de santé (Nicolle *et al.*, 2008).

Le caractère nosocomial est basé essentiellement sur le délai écoulé entre l'admission et le début de l'infection. Ce délai doit être supérieur à la durée d'incubation de l'infection. L'infection nosocomiale survient donc :

- **Après les 48 premières heures d'hospitalisation** : le délai de 48h correspond à la durée d'incubation minimum d'une infection aiguë liée à une bactérie à croissance rapide.

- **Dans les 30 jours** après intervention chirurgicale (si chirurgie).

- **Dans l'année qui suit la mise en place** de matériel chirurgical (implant ou prothèse...)

Lorsque la situation précise à l'admission n'est pas connue, un délai d'au moins 48 heures après l'admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation, lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour distinguer une infection nosocomiale d'une infection communautaire (Bergogne, 1995 ; [2]).

Selon le comité des ministres du conseil de l'Europe (25 Octobre 1984), on appelle infection hospitalière toute maladie contractée à l'hôpital ou dans une structure de soin, due à des micro-organismes bactériennes, virales, parasitaires, fongiques ou à prion cliniquement et ou microbiologiquement reconnaissables et identifiable qui affectent :

- Soit le malade.

- Soit le personnel hospitalier du fait de son activité et que les symptômes des maladies apparaissent ou non.

2-Facteurs de risque infectieux :

2-1- Services à haut risque infectieux

Ces infections sont plus importantes dans les services médicaux lourds : Réanimation polyvalente ou chirurgicale et soins intensifs, diabétologie, néonatalogie et oncologie (voir tableau 1) (Bergogne,1995)

Tableau 01 : Zones à risque à l'hôpital (Figarella *et al.*, 2007).

1	2	3	4
Risques minimales	Risques moyens	Risques sévères	Très hauts risques
Halls	Circulations	Soins intensifs	Néonatalogie
Bureaux	Ascenseurs	Réanimation	Bloc opératoire
Services	Escaliers	Urgences	Service de greffe
Administratifs	Salles d'attente	Salle de « petite chirurgie »	Services de brûlés
Services techniques	Consultation externe	Salle de soins post	
Résidence pour personnes âgées	Salle de rééducation fonctionnelle	interventionnelle (salle de réveil)	
	Maternité	Salle d'accouchement	
	Unité d'hébergement pour personnes âgées	Nurserie	
	Services long et moyen séjour	Biberonnerie	
	Psychiatrie	Pédiatrie	
	Stérilisation centrale (zone lavage)	Chirurgie	
	Pharmacie	Médecine	
	Blanchisserie	Hémodialyse	
	Sanitaires	Radiologie	
		Laboratoires	
		Exploration fonctionnelle	
		Salle d'autopsie	
		Imagerie médicale	
		Oncologie	
		Hématologie	
		Hémodynamique	
		Endoscopie	

2-2- Facteurs liés aux malades :

2-2-1- Les pathologies préexistantes :

Concerne l'état de santé du malade par rapport au : diabète, insuffisance rénale, insuffisance hépatique, incontinence urinaire, leucopénie et cancer (Immunodépression)

(Avril *et al.*,1998 ; [3]).

2-2-2- la pathologie à l'origine de l'hospitalisation :

- Poly traumatisme (Accident de la circulation, chute d'une hauteur).
- Brûlures étendues.

2-2-3- L'état nutritionnel non satisfaisant :

La dénutrition est un facteur important favorisant les infections nosocomiales car elle provoque une atrophie de toutes les muqueuses. A l'opposé, l'obésité peut représenter un facteur de risque en favorisant les abcès pariétaux post opératoires (Diakite ,1996).

2-2-4- L'âge : Avant 1 an et après 65 ans, le risque infectieux est majoré (Timbine ,1998).

2-3-Facteurs liés aux techniques diagnostiques et thérapeutiques :

La nature et la qualité des soins influent sur le taux d'infections nosocomiales :

-Certains traitements agressifs tels que les perfusions, cathétérismes et sondes à demeure, constituent des portes d'entrée faciles pour l'agent infectieux.

-L'encombrement du service, le défaut d'isolement des malades infectés et des antibiotiques administrés abusivement comme « couverture » augmentent le risque infectieux en favorisant la sélection de bactéries multi résistantes, au sein de la flore hospitalière.

Parmi les facteurs liés aux techniques diagnostiques et thérapeutiques on distingue :

2-3-1 Les actes invasifs :

Ce sont particulièrement tous les procédés iatrogènes lésant le revêtement cutanéomuqueux (endoscopie respiratoire, digestive ou génito-urinaire, mise en place de sondes, cathéters, trachéotomies, et iléostomie) ou permettant l'inoculation directe de bactéries dans la circulation sanguine (cathétérisme vasculaire, explorations hémodynamiques, injections veineuses, ponctions sternales).

Par ailleurs, les atteintes du système nerveux central, apanages des services de réanimation mais également observés dans les suites de certaines explorations, peuvent abolir des réflexes (réflexes nauséux, épi glottiques) ou certaines fonctions.

Les malades présentant des comas prolongés, des tumeurs cérébrales et les paratétraplégiques sont candidats à des infections nosocomiales souvent respiratoires, urinaires ou cutanées (Brun,1996)

2-3-2- Le traitement chirurgical :

Le type de chirurgie est un important facteur de risque.

Le taux d'infection pariétale est différent selon qu'il s'agisse d'une chirurgie propre, propre-contaminée, contaminée ou sale (Bergogne, 1995).

Tableau 2: Taux d'infection pariétale en fonction du type de chirurgie (Bergogne, 1995).

Type de chirurgie	description	Taux d'infection pariétale
Chirurgie propre	Pas d'ouverture de viscère creux Pas d'inflammation notée Pas de faute d'asepsie	<2%
Chirurgie propre-contaminée	Ouverture d'un viscère creux sans contamination significative	5 à 10%
Chirurgie contaminée	Viscère creux ouvert ou inflammation+++	15 à 30%
Chirurgie sale	Pus + Perforation de viscère	30 à 50%

2-3-3- Les traitements diminuant la résistance à l'infection :

Certains traitements aggravent l'état d'immunodépression dans lesquelles se trouve une catégorie donnée de patients. Ces traitements agressifs sont la radiothérapie, la chimiothérapie et la corticothérapie

Ainsi, les infections nosocomiales induites chez les sujets neutropéniques (déficients en polynucléaires neutrophiles), souvent à la suite d'une chimiothérapie anti-leucémique sont gravissimes. (Brun,1996)

2-3-4- Les erreurs dans l'organisation des soins :

Dans certains services, le risque infectieux est lié à la précarité des installations, au manque ou à la mauvaise répartition du personnel soignant conduisant à l'encombrement des box. Il peut être également du à des fautes qui incombent du personnel médical, paramédical, ou du personnel chargé de l'hygiène des locaux. On distingue :

- l'antibiothérapie à l'aveugle : l'utilisation des antibiotiques à large spectre sélectionne les bactéries multi résistantes aux antibiotiques et diminue l'effet barrière de la flore commensale.

- la désinfection insuffisante.

- la stérilisation de mauvaise qualité.

- Asepsie insuffisante (Brun,1996 ; [4])

2-4-Facteurs liées à l'environnement :

L'environnement hospitalier est largement contaminé par des microorganismes d'origine humaine ou spécifiquement environnementaux, Les microorganismes présents dans l'environnement hospitalier sont extrêmement variés (Bactéries, levures, champignons filamenteux, virus et parasites) et peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes qui ne manifestent leur virulence que sur un organisme dont les défenses immunitaires sont affaiblies, qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme . Cette contamination n'est le plus souvent que partielle et transitoire. (Hajjar *et al.*, 2000 ; CTIN, 2002).

3- Sources de germes à l'hôpital (Réservoir) :

Elle est définie comme un maillon dans la chaîne de transmission vers le patient, c'est-à-dire le lieu de contact entre le malade et le microorganisme qui donne naissance à la dissémination d'infection à un moment donné.

Les microorganismes responsables des infections nosocomiales ont un réservoir soit humains, animal soit situé dans l'environnement hospitalier [5].

3-1- Réservoir humain :

-Les Mains du personnel soignant médical et paramédical : est un réservoir et véhicules de germes de patient à patient : Infection croisée manu portée.

- **Les Flores microbiennes** : des malades, des personnels soignants et des visiteurs sert au :

- Transport d'une bactérie multi-résistant (BMR) par un patient infecté ou colonisé, d'un service à l'autre (dissémination)

- Transmission à un ou plusieurs patients, d'une bactérie ou d'un virus, par un personnel soignant malade ou porteur sain, exp : infection par le virus grippal.

3-2- Réservoir de l'environnement hospitalier :

- **Le Matériel médico-chirurgical** : de mauvaise stérilisation ou mal désinfection comme les endoscopes, les instruments chirurgicaux, les compresses stériles, les champs opératoires.

-Les médicaments et produits biologiques :

Ils peuvent être une source de contaminations comme les poches de sang, les produits sanguins, les labiles et le sérum salé servant comme solvant lors des perfusions médicamenteuses (Héparinothérapie par seringue électrique), les antiseptiques (Eosine Aqueuse) et les collyres ophtalmologiques [6].

-L'air en milieu hospitalier :

L'air ambiant est chargé de germes véhiculés par des gouttelettes salivaires, des squames cutanées et des poussières.

L'air contaminé peut occasionner des pneumopathies nosocomiales telles que les aspergilloses pulmonaires et légionelloses (contaminé par aérosols).

-L'eau stérile à l'hôpital :

L'eau est stérilisée grâce à des systèmes utilisant des lampes UV ou des filtres bactériologiques où un défaut de stérilisation peut occasionner des infections de pneumopathie à pyocyanique exp : *Serratia sp.* ou *Legionella pn.*

L'eau dans l'hôpital est utilisé en bloc opératoire, en humidificateurs de respirateurs, dans les nébuliseurs, l'eau des Barboteurs d'oxygène en réanimation, l'eau des incubateurs de biberon et les liquides de dialyse [6].

-Les aliments consommés par les malades hospitalisés :

Il est important de veiller et à contrôler la qualité et la température de conservation des aliments. De plus, la préparation des plats doit être assurée par un personnel dont l'hygiène est importante à contrôler et qui doit faire l'objet d'un dépistage régulier de germes (portage nasal de *Staphylocoque*, portage intestinal des bactéries entéropathogènes et des parasites).

-Les locaux:

L'hygiène générale des locaux soit (mobilier, sol et murs) et literie (draps et couverture) est primordiale afin d'éviter la colonisation des flores du malades (peau, intestin) par des bactéries multi résistantes qui vont secondairement causer des infections nosocomiales chez ces patients.

3-3-Réservoir animal :

Les animaux sauvages ou domestiques constituent un réservoir des microorganismes. Les maladies qui affectent les animaux et peuvent se transmettre aux humains sont appelées zoonoses. Ex : la maladie de brucellose qui affecte les vaches et peut transmettre à l'être humain et entraîne des maladies infectieuses transmissibles entre les gens [7].

4- Modes de transmission :

On distingue plusieurs types d'infections nosocomiales qui relèvent quatre grands modes de transmissions qui peuvent prendre deux origines illustré dans la figure 1.

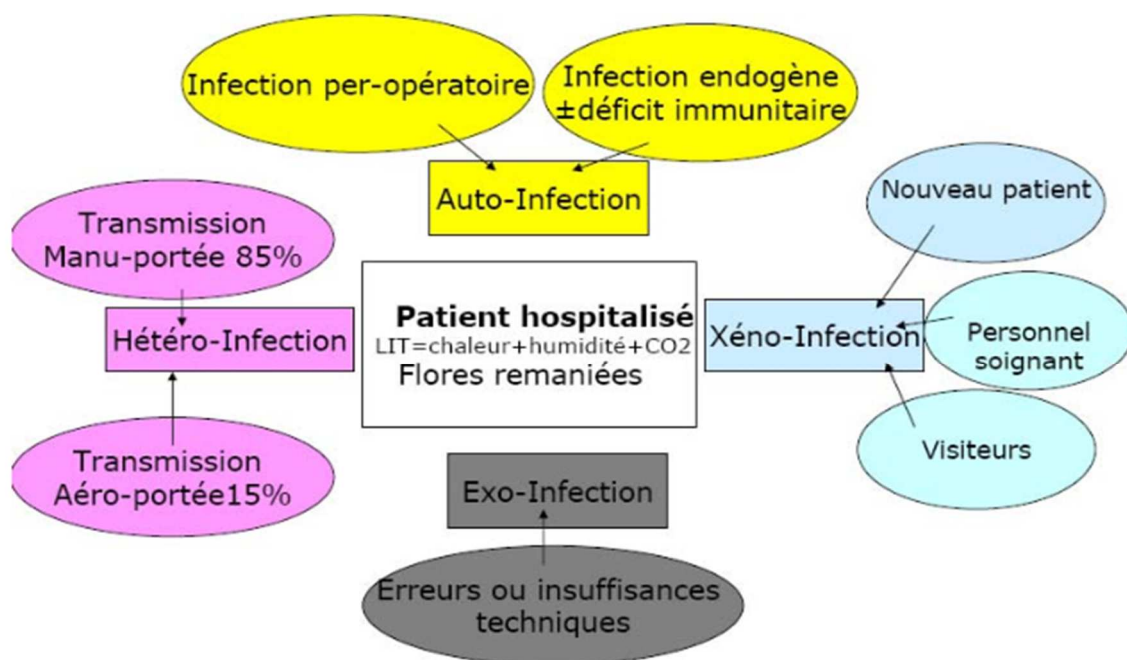


Figure1 : Les différents modes de transmission des infections nosocomiales (Brun, 1996)

4-1-1-L'infection d'origine endogène :

A- Auto-infections :

Le patient peut s'infecter avec ses propres germes qui peuvent être ceux de la peau, des muqueuses et du tractus digestif, etc, et la dissémination des germes du patient dans son environnement (comme par exemple le lit), le lit est un excellent biotope pour le développement des bactéries du fait de son microclimat : 37°C, humidité et teneur élevée en CO₂ par l'utilisation de traitement pouvant altérer (Berche *et al.*, 1996).

Cette auto-infection peut correspondre à 2 origines :

➤ Une infection endogène :

Le germe envahit l'organisme à partir de la flore des cavités naturelles, à la suite d'un déficit général de l'immunité (septicémie à germe intestinal chez un sujet aplasique) ou sans déficit immunitaire (infection urinaire

➤ Une infection per-opératoire :

A l'occasion d'un acte chirurgical (ouverture d'un viscère creux par exemple).
Les malades atteints d'une auto-infection constituent une source importante de germes et sont à l'origine d'hétéro- infections [8].

4-1-2-L'infection d'origine exogène :

A. -Hétéro -infections :

Elle est la conséquence d'une contamination d'un malade par le microorganisme responsable des lésions infectieuses à un autre malade.

La contamination est presque toujours manu portée 85 % des cas ou le germe responsable provient à partir du personnel soignant intervenant auprès de plusieurs patients et plus rarement aéroportée 15 % transmis par voie aérienne comme celui de la tuberculose (Mergoud,2004 ; [8]).

B- Xéno- infections :

Ce sont les infections consécutives à l'entrée des nouveaux individus nouveaux dans le biotope hospitalier : nouveaux patients, personnels et visiteurs (représentent eux- même une pathologie infectieuse), déclarée ou en cours d'incubation.

Ce mode de transmission n'est cependant pas à négliger, car il peut être dévastateur pour les patients particulièrement fragiles exp : gastro-entérites à *E. coli*, *Salmonella* ou Rota virus dans les services pédiatriques (Mergoud,2004 ;[8]).

C- Exo- infections :

Elles sont dues à des erreurs ou des insuffisances techniques (dysfonctionnement) d'un matériel destiné à la protection des patients qui ne remplissant plus son office, les laisse en contact avec des germes qui ne devraient en principe pas faire l'objet d'une infection :

Soit stérilisation ou ventilation inefficaces, pose de cathéters sans asepsie rigoureuse.

Soit à des erreurs dans l'exécution des procédures de traitement de matériel médicochirurgicale : Le bloc opératoire est un lieu à haut risque car une atmosphère stérile ne peut être garantie (Mergoud, 2004 ;[8]).

5-Surveillance et prévention contre les infections nosocomiales :

5-1-Surveillance :

La surveillance des infections nosocomiales est une activité essentielle car elle permet de produire les informations épidémiologiques indispensables pour :

- mesurer le niveau des risques infectieux dans un établissement de soins,
- définir la politique de prévention à mener par le Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales et l'équipe opérationnelle d'hygiène hospitalière,
- évaluer l'efficacité de cette politique de prévention : les données issues de la surveillance peuvent constituer un indicateur utilisable pour mesurer l'impact d'un programme de prévention (Allaouchie *et al.*, 2000)

Pour être efficace, un programme de surveillance doit permettre de :

- détecter les tendances et les changements dans la fréquence de survenue des cas,
- détecter les épidémies ou tout autre phénomène nouveau ou inhabituel,
- évaluer et améliorer les pratiques des professionnels hospitaliers (équipes médicales et paramédicales).
- stimuler la recherche épidémiologique sur les facteurs de risque ainsi que sur les moyens de contrôle et de prévention
- Enfin, un retour d'information rapide aux équipes médicales et paramédicales concernées, pour que soient mises en place les mesures de contrôle et de prévention adaptées (Bergogne, 1995 ; Avril *et al.*, 1998).

5-2-Prévention :

L'hygiène hospitalière est à la base de la prévention des infections nosocomiales. Elle prend en compte l'ensemble des aspects cliniques, microbiologiques et épidémiologiques des infections mais également l'organisation des soins, la maintenance des équipements hospitaliers, la gestion de l'environnement et la protection du personnel [9].

Les préventions des IN consistent :

- D'une part à poser un certain nombre de barrière dans le but d'empêcher la transmission des germes d'un patient à un autre, du personnel au soignant, du patient au personnel ou du matériel au patient (ou soignant).
- D'autre part à traiter les malades infectés avec un antibiotique adéquat pour réduire le réservoir et la source des microorganismes (Acar *et al.*, 1997).

Des agents pathogènes très divers peuvent être à l'origine d'infections nosocomiales. Ces agents infectieux varient selon les populations de patients et les types d'établissements de santé, d'un établissement à l'autre et d'un pays à l'autre.

1- Virus :

Ce sont des micro-organismes de petite taille ne pouvant en principe être observés qu'à l'aide du microscope électronique, ils sont obligatoirement parasites de l'hôte qui les héberge (animal, végétal ou homme) car ils ne peuvent se reproduire qu'à l'intérieur d'une cellule vivante. Il n'existe pas d'intermédiaire entre bactéries et virus.

La fréquence des infections virales nosocomiales est évaluée à 5% et est probablement sous-estimée pour les raisons suivantes : Pas assez d'études, souvent pas de signes d'appel et symptomatologie retardée et souvent banale.

Il existe une possibilité de transmission nosocomiale pour de nombreux virus, notamment ceux des hépatites B et C (transfusions, dialyse, injections, endoscopie), le virus respiratoire syncytial, les rota virus et les entérovirus (transmis par contact main bouché et par voie fécaux-orale), d'autres virus comme le cytomégalovirus, le VIH, le virus Ebola, les virus grippaux, les virus de l'herpes et le virus varicelle zona, sont également transmissibles.

Les principales voies de transmission des virus à l'origine d'infection nosocomiale sont : les voies digestive, respiratoire, cutané muqueuse et l'exposition au sang à des liquides biologiques ou à des tissus infectés (Bergogne,1995). (Voir figure 2)

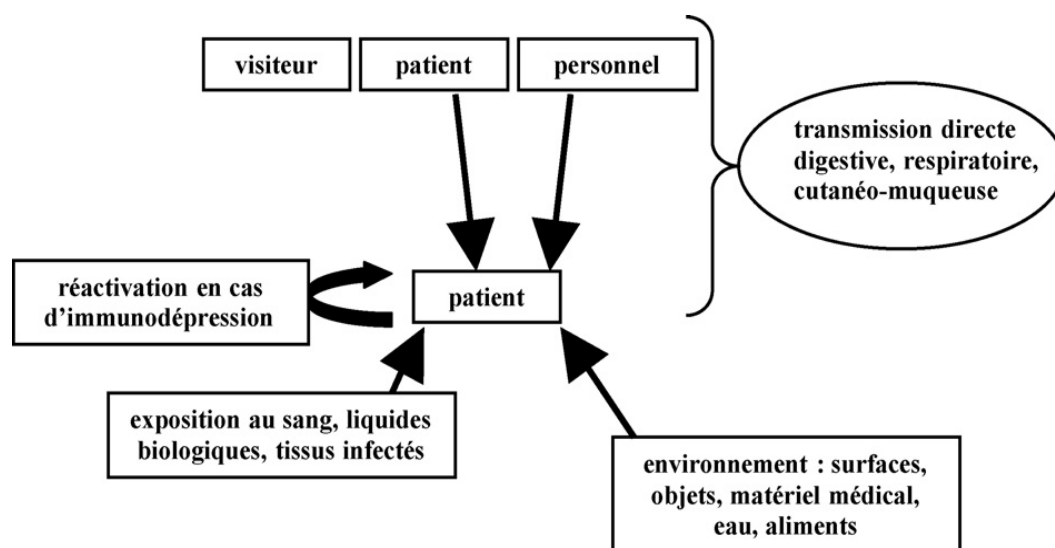


Figure 2 : Schéma des différentes sources d'infections nosocomiales virales (Bergogne,1995).

1 -1-Les formes des infections nosocomiales virales :

Globalement, on peut distinguer 3 grandes formes d'infections nosocomiales virales :

➤ Formes épidémiques:

- à transmission féco-orale: comme le rota virus responsable des diarrhées infantiles
- à transmission respiratoire: comme le virus respiratoire syncytial (VRS) apanage des

services de pédiatrie entraîne des atteintes ORL et pulmonaires chez l'enfant,

- Le virus de la grippe (chez les personnes âgées ou immunodéprimés).

➤ Formes latentes:

- Par réactivation : Cytomégalovirus (CMV), Herpes simples virus (HSV 1 et 2)
- Varicelle zona virus (VZ) et Epstein Barr virus (EBV)

➤ Formes chroniques: HIV - Hépatites B et C particulièrement contagieuses.**1 -2-Les types des virus :**

Selon le mode de transmission on distingue :

➤ Les virus à transmission respiratoire:

-Virus respiratoire syncytial (VRS) apanage des services de pédiatrie.

-Virus de la grippe :

*Chez les personnes âgées.

*Immunodéprimés. (Hall *et al.*, 1981)

➤ Les virus impliqués dans les réactivations:

-Cytomégalovirus (CMV)

-Herpes simples virus (HSV 1 et 2)

-Varicelle zona virus (VZ)

-Epstein Barr virus (EBV)

➤ Les virus à transmission sanguine: (principaux virus)

- Virus de l'immunodéficience humaine HIV

-Virus de l'hépatite B.

-Virus de l'hépatite C.

-Agents transmissibles non conventionnels (Prions) (Bouvet,1993)

2-Parasites :

Ce sont des êtres vivants qui vivent au dépend d'un autre être vivant supérieur, On distingue:

-Les protozoaires: parasites unicellulaires à développement intracellulaire certains sont flagellés, d'autres sont ciliés et d'autres émettent des pseudopodes.

-Les Métazoaires: parasites pluricellulaires, ce sont des organismes vivants complexes et représentés chez l'homme par les Helminthes [10].

Les IN dues à ces êtres vivants résultent de l'interaction de différents facteurs:

*Présence d'une source de parasite.

*Présence d'un vecteur.

*Etat de moindre résistance du patient face à l'agression des parasites [11].

Cette infestation peut être :

*Soit directe d'un être parasité avec un être sain, ou bien, par voie orale en infestant des formes de résistance et de dissémination: Kystes et œufs d'helminthes.

*Soit indirecte par voie transcutanée, lorsque le parasite s'introduit à la suite d'une piqûre d'un hôte intermédiaire (Torres *et al.*, 2011)

3- champignons :

Ce sont des êtres inférieurs ayant une structure plus complexe, comportant des lipides, des cholestérols et des modes de reproduction plus particuliers, Leur pouvoir pathogène est en relation avec leur pénétration intra-tissulaire.

De nombreux champignons se multiplient sous forme filamenteuses, provoquant des destructions tissulaires et des réactions inflammatoires.

Les infections fongiques sont un bon témoin de l'évolution des risques infectieux en milieu hospitalier, qu'il s'agisse des champignons levuriformes, en particulier des *Candida*, ou des *Aspergillus*. Ces agents infectieux sont avant tout des commensaux ou des saprophytes de notre environnement, à répartition ubiquitaire [11]

Les levures représentent 6, 2% des micro-organismes en cause des IN .*Candida albicans*, commensale des muqueuses, peut être la cause d'épidémie en pédiatrie, comme il peut y avoir également une surinfection exagérée de ce microorganisme au niveau des cathéters veineux, ces infections sont surtout rencontrées dans les déficits de l'immunité cellulaire (Bergogne,1995).

3- Prions :

Certains désordres neurologiques sont causés par des protéines infectieuses (prions). L'agent infectieux en question semble être dépourvu d'acides nucléiques et être entièrement composé de protéines ; ce qui pose un problème conceptuel majeur, étant donné que partout ailleurs, l'ADN et l'ARN jouent exclusivement le rôle transmetteur de l'information génétique. L'existence d'une protéine capable de convertir une protéine "normale" en un prion est actuellement l'hypothèse la plus répandue et il existe certaines observations qui la confirment.

Le prion, en pénétrant dans le cerveau de sa victime, adhérerait à la protéine parente "normale", ou pré-prion et la transformerait en prion. Le processus s'accélérait avec l'accumulation des prions, menant à la destruction du tissu cervical et irrémédiablement à la mort (Torres *et al.*, 2011).

Plusieurs maladies animales et humaines causées par ces agents, une meilleure étude de cette maladie est celle de la tremblante du mouton, la maladie de la vache folle.

4- Bactéries :

Ce sont les plus courants des agents pathogènes responsables d'IN.

4 -1- Les bactéries commensales

Elles sont présentes dans la flore normale des sujets en bonne santé, elles jouent un rôle protecteur significatif en empêchant la colonisation par des micro-organismes pathogènes. Certaines bactéries commensales peuvent provoquer une infection si les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies. Par exemple, les staphylocoques cutanés coagulase négative provoquent des infections sur cathéter vasculaire et les *Escherichia coli* présentes dans l'intestin sont la cause la plus courante des infections urinaires (Michel *et al.*, 2005).

4 -2- Les bactéries pathogènes

Elles ont une virulence plus élevée et provoquent des infections (sporadiques ou épidémiques) quel que soit l'état immunitaire de l'hôte. Par exemple :

- Bacilles anaérobies à Gram positif** (par exemple *Clostridium*) provoquent la gangrène.
- Bactéries à Gram positif** : *Staphylococcus aureus* (bactérie cutanée qui colonise la peau et le nez du personnel hospitalier et des patients) provoque une grande variété d'infections pulmonaires, osseuses, cardiaques et sanguines et résiste fréquemment aux antibiotiques. Les *streptocoques* bêta-hémolytiques sont également des agents pathogènes importants.

- **Bactéries à Gram négatif** : les entérobactéries (par exemple *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* et *Serratia marcescens*) peuvent coloniser certains sites lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (site d'insertion d'un cathéter, d'une canule, sonde urinaire) et provoquer des infections graves (infection du site opératoire, infection pulmonaire, bactériémie, infection du péritoine), elles peuvent également être hautement résistantes. Les micro-organismes à Gram négatif comme *Pseudomonas* spp, sont souvent isolés dans l'eau et les milieux humides. Ils peuvent coloniser les voies digestives des patients hospitalisés (Michel *et al.*, 2005).

-Plusieurs autres bactéries représentent un risque spécifiquement hospitalier. Par exemple, les diverses espèces de *Legionella* peuvent provoquer des pneumopathies par inhalation d'aérosols impliquant de l'eau contaminée (Voir tableau 3)

Tableau3 : Principaux microorganismes pathogènes responsables d'infections nosocomiales (Pechère *et al.*, 1991)

Micro organisme	Fréquence Relative	Sites habituels	réservoirs	Voies de transmission
<i>E. coli</i>	19.2 %	Appareil urinaire, sang	Tube digestifs (malades et personnels)	Mains cathéters urinaire
<i>Staphylococcus.aureus</i>	10.2 %	Plaies chirurgicales peau, sang	Peau (malades et personnels)	Mains, air, cathéters, I.V
Entérocoques Et autres Streptocoques	9.5 %	Urine, plaies chirurgicales	Tube digestif (malades Et personnels)	Mains, air, cathéters, Urinaires
<i>Pseudomonas.aeruginosa</i>	9 %	Urine, brulures, Appareil respiratoire, sang	Peau muqueuses	Mains, air, liquides
<i>Proteus</i>	7.7 %	Urine, plaies	Tube digestif	Mains
<i>Klebsiella</i>	7.7 %	Chirurgicales	(malades	Liquides
<i>Enterobacter</i>	4.3 %	Appareils	Et personnels	Contaminés
<i>Serratia</i>	2 %	respiratoires sang	objets)	

4-3-Caractéristiques des bactéries nosocomiales :

- Grande vitalité :

Bactéries saprophytes (*pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Entérobactéries*)

Bactéries commensales des flores humaines et animales (*Entérobactéries*, *Staphylocoques*)

-Aptitudes nutritionnelles :

- Aptitude à utiliser divers substrats.
- Croissance possible sur divers milieux de culture sélectifs.
- Culture possible en milieu minimum.
- T° de croissance très variable: 4°C à 45°C.
- Aérobie strictes ou facultatives.

-Aptitudes à l'adhérence par le biais de biofilm, sur divers matériels médico-chirurgicaux : c'est la colonisation bactérienne c'est-à-dire la multiplication de germes en l'absence de réaction inflammatoire où le passage de l'étape de colonisation à l'étape d'infection est possible mais ses mécanismes sont mal connus.

-Aptitudes à développer des multi résistances aux antibiotiques :

Ce sont le plus souvent des résistances acquises, par transferts d'ADN extra-chromosomiques (plasmides, transposons..), des mécanismes surtout enzymatiques.

Les principales BMR sont retrouvées parmi les espèces suivantes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline , *Acinetobacter* (surtout *baumanii*), *Enterococcus*, les entérobactéries des groupes *Klebsiella* *Enterobacter* *Serratia* (K.E.S.) et *Proteus* *Providencia*, *Morganella* (PPM) (Brun ,1996).

-Aptitudes selon l'état du malade :

Chez les malades dont les défenses immunitaires sont intactes, les streptocoques (pneumocoque et entérocoques) et *Staphylococcus aureus* sont les micro-organismes les plus fréquemment rencontrés. *Staphylococcus aureus* est le pathogène typique des années 1950-60. Il est responsable entre autre, des complications des plaies chirurgicales, des brûlures.

Chez les malades dont les défenses immunes sont affaiblies on rencontre surtout des bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas*, *Acinetobacter* et des entérobactéries : *E. coli*, K.E.S., P.P.M.), mais aussi de plus en plus des staphylocoques à coagulase négative.

Au cours des dernières années, du fait de l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés, les champignons (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) et certains parasites (*Toxoplasma gondii*) prennent une place grandissante.(Donlan *et al.*,2002).

La résistance résulte de l'aptitude de certaines bactéries à supporter l'attaque de médicaments antimicrobiens tels que les antibiotiques (ATB), de sorte que les traitements classiques deviennent inefficaces et que les infections persistent et accroissent le risque de propagation.

La problématique de la résistance bactérienne aux antibiotiques en médecine est rattachée à deux causes :

- Une variation génétique impressionnante des bactéries qui pourrait rendre les bactéries résistantes à n'importe quel anti-infectieux.
- Une dissémination de souches bactériennes résistantes souvent multi résistantes (Fritz *et al.*, 2008 ; Paul *et al.*, 1997).

1. Définition :

Une souche bactérienne est considérée résistante à un antibiotique donné, lorsqu'elle est capable de croître en présence de cet antibiotique, à une concentration significativement plus élevée que celle normalement active sur les souches sensibles de cette espèce.

Des espèces bactériennes ou certaines souches d'une même espèce bactérienne peuvent être résistantes à l'action d'un ou de plusieurs ATB. La résistance bactérienne résulte toujours de l'incapacité de l'ATB à agir sur sa cible, du fait de la réaction des bactéries vis à vis de l'ATB, exprimé par divers mécanismes (Bousseboua, 2005).

Dans le domaine médical, une souche bactérienne est considérée résistante si le traitement ATB appliqué ne peut permettre d'atteindre une concentration sanguine de l'ATB au moins égale à sa concentration minimale inhibitrice (CMI) (Debadza, 2015).

2. Types de résistance :

Les résistances bactériennes aux antibiotiques peuvent être naturelles ou acquises.

2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle, appelée aussi résistance intrinsèque est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Elle est programmée sur le génome bactérien, donc fixe et constante à l'intérieur du taxon et transmise à la descendance.

A ce titre, elle constitue un critère d'identification des bactéries et détermine le phénotype « Sauvage » des bactéries (Doublet, 2004).

2.2. Résistance acquise

Le terme de résistance acquise est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. Les résistances acquises sont dues à des modifications génétiques, consistant en des mutations sur des gènes déjà présents chez la bactérie ou en l'acquisition de nouveaux gènes de résistance par transfert horizontal (gènes transférés d'un autre micro-organisme) (Leclerc *et al.*, 1995).

2-2-1- Résistances par mutation chromosomique

La résistance par mutation est peu répandue en clinique (moins de 20% des résistances acquises). Ce type de résistance est observé, entre autres, chez les mycobactéries. Les résistances mutationnelles sont:

- *spontanées: elles préexistent à l'utilisation de l'antibiotique.
- *stables: elles se transmettent verticalement dans le clone bactérien.
- *spécifiques: elles n'intéressent qu'un antibiotique ou qu'une seule famille d'antibiotiques.
- *rares: le taux de mutation se situe habituellement entre 10^{-7} et 10^{-8} (Leclerc *et al.* 1995).

2-2-2-Résistances extra-chromosomiques

Les résistances extra-chromosomiques sont fréquentes (plus de 80% des résistances acquises) et contagieuses. Les supports de ces résistances peuvent être des plasmides qualifiés plasmides de résistance (p.R) ou des transposons acquis par conjugaison ou plus rarement par transduction. Ces résistances se transmettent horizontalement entre bactéries cohabitant même d'espèces différentes (Leclerc *et al.*, 1995; Bathily, 2002). Du fait que les plasmides R codent le plus souvent pour plusieurs résistances aux antibiotiques, appartenant à des familles différentes, leur acquisition confère une résistance multiple qui pose de grands problèmes dans l'utilisation thérapeutique des antibiotiques (Bousseboua, 2005).

2-2-3-Résistance croisée :

La résistance croisée est un phénomène par lequel une bactérie qui a développé une résistance à l'un des antibiotiques d'une classe devient aussi résistante aux autres membres de la même classe. Cela même si elle n'a jamais été exposée à ces molécules. C'est cette résistance croisée qui permet aux β -lactamases à spectre étendu (BLSE) présentes chez les bactéries à Gram négatifs d'avoir une résistance si étendue (β -lactamines et céphalosporines) à tel point qu'elles deviennent un véritable enjeu en santé humaine (Julie, 2014).

2-2-4- Co-résistance

Plusieurs mécanismes de résistance sont associés chez la même bactérie, parfois stabilisés par intégration dans le chromosome. Chacun des mécanismes confère par résistance croisée la résistance à un groupe d'antibiotique conférant à la bactérie un large spectre de résistance. (Stéphanie, 2009).

3- Mécanismes de Résistance :

Il existe quatre principaux mécanismes de résistance des bactéries présentes dans la figure 3 et 4 et le tableau 4.

Tableau 4 : Mécanisme de résistance [12]

Mécanisme de résistance	Conséquences
Inhibition enzymatique	Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique Mécanisme de résistance le plus répandu
Réduction de la perméabilité cellulaire	Changements de perméabilité de la paroi ou de la membrane bactérienne empêchant le médicament d'atteindre sa cible
Altération des sites de liaison ciblés par l'antibiotique	Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action
Pompes à efflux	Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devenant inaccessible

4- Facteurs contribuant à la résistance :

L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques sont le résultat d'une pression sélective exercée par les agents antimicrobiens et de la transmission des microorganismes résistants (Simonsen *et al.*, 2004).

Les principaux facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance bactérienne sont présentés dans le tableau 5.

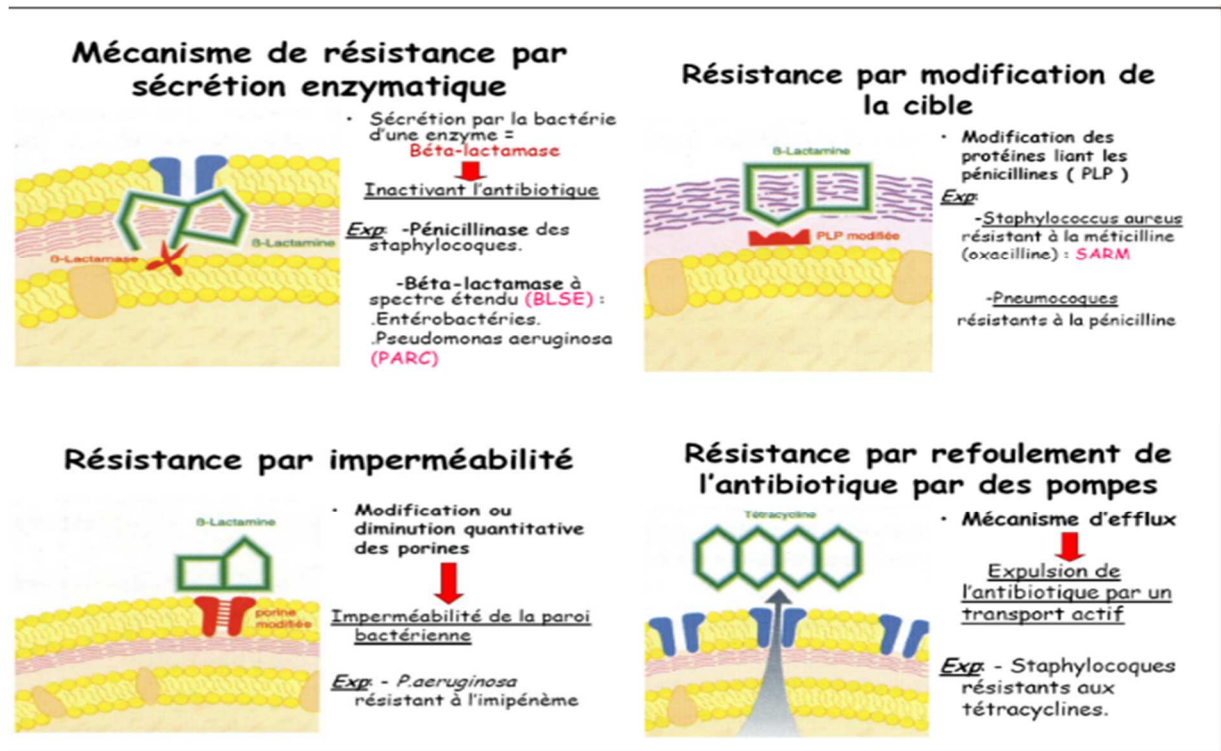


Figure3 : Mécanisme de résistance (Donlanrm *et al.*, 2000).

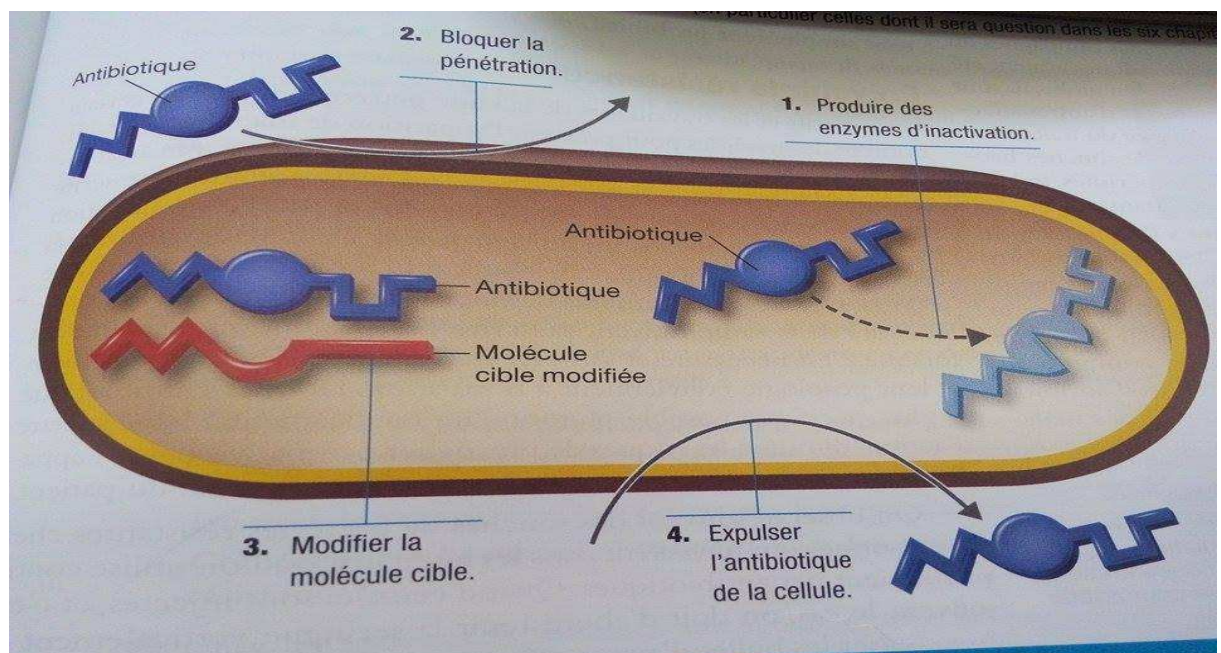


Figure 4 : Les différents mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques (Gerard *et al.*, 2011).

Tableau 5: Facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques**(Murthy, 2011 ; Rybak, 2004)**

Facteurs	Exemples (liste exhaustive)
Emergence de la résistance	<ul style="list-style-type: none"> -Usage abusif d'antibiotique. -Gravité accrue de l'état des malades hospitalisés. -Manque de fidélité au traitement. -Durée trop courte ou dose sous-thérapeutique. -Diagnostic non confirmé d'infection bactérienne. -Utilisation inadéquate d'antibiotique dans les pays en voie de développement.
Propagation des souches résistantes	<ul style="list-style-type: none"> -Mesures d'hygiène inadéquate dans les hôpitaux -Non- respect des directives de lutte contre les infections. -Promiscuité des patients hospitalisés. -Réduction du personnel infirmier et de soutien -Déplacement accrus des patients (transferts de patients colonisés ou infectés entre hôpitaux et milieu communautaire). -Voyages internationaux.
Utilisation d'antibiotiques dans le secteur agro-alimentaire	<ul style="list-style-type: none"> -Animaux destinés à la consommation. -Agriculture et aquaculture.
Utilisation d'antiseptiques de désinfectants	<ul style="list-style-type: none"> -Agents antibactériens dans les produits d'entretien ménager, le dentifrice, les pastilles contre le mal de gorge, les savons, etc

5-Principaux bactéries multi résistantes:

Les bactéries sont dites multi résistantes (**BMR**) aux antibiotiques du fait de L'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. La multi résistance est une étape vers l'impasse thérapeutique. En Raison de leur fréquence élevée, de leur potentiel pathogène, de leur caractère commensal qui expose au risque de diffusion hors de l'hôpital, de leur caractère clonal ou du caractère aisément transférable des mécanismes de résistance impliqués [3], les principaux BMR qui font l'objet du programme national :

5-1-Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM) :

Staphylococcus aureus est l'une des principales espèces responsables d'infections d'IN, il représente de 5% à 10% des bactéries isolés, c'est une bactérie commune présente sur la peau et les membranes muqueuses chez 20 à 30 % des personnes en bonne santé, elle peut parfois provoquer des infections chez l'homme, généralement localisées au niveau de la peau ou de plaies.

Par ailleurs certaines souches de cette bactérie ont développé une résistance aux antibiotiques β -lactamines, qui comprennent les pénicillines qui sont utilisés pour le traitement de nombreuses infections. Ces souches sont appelées *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

Les SARM sont principalement incriminés dans les infections cutanées, du site opératoire 30% des voies urinaires et respiratoire 20% et les bactériémies 10%.

Le réservoir des SARM est essentiellement humain représenté par les malades colonisés ou infectés, leur résistance vis-à-vis de ces antibiotiques se manifeste sous les mécanismes de :

- Hyperproduction de β -lactamases.

- Production d'une méticillinase capable d'hydrolyser la méticilline (Vincent, 2000).

5-2-Entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre élargi (BLSE) :

Les entérobactéries peuvent résister aux β -lactamines (Les β -lactamines représentent la principale famille d'antibiotiques) par production des β -lactamases, des enzymes qui catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame des β -lactamines, en donnant un produit qui perd totalement son activité antimicrobienne (Matagne *et al.*, 1998).

Les principaux mécanismes de résistance à détecter chez les entérobactéries sont:

* Résistance aux β -lactamines par inactivation enzymatique par les β -lactamases;

* Résistance aux fluoroquinolones par modification de la cible.[13]

* Résistance aux aminosides par inactivation enzymatique (Fauchère, 1997).

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) constituent un groupe d'enzymes qui ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, aux céphalosporine de première, deuxième et troisième générations (C1G, C2G et C3G), à l'aztréonam (mais non aux céphamycines et carbapénèmes) par hydrolyse de ces antibiotiques, et qui sont inhibées par les inhibiteurs des β -lactamases tel l'acide clavulanique (Bush *et al.*, 1995).

5-3-Entérobactéries productrices de céphalosporinases (EBCASE).

Les céphalosporinases étaient connues comme des enzymes chromosomiques retrouvées chez le *Pseudomonas aeruginosa* et pouvaient être induites par des antibiotiques, comme la céfoxitine, la céfotaxime et la céftazidime. L'hyperproduction de ces enzymes est associée à une diminution du nombre de porines dans la membrane externe des bactéries.

La transmission plasmidique et la promiscuité dans la famille des entérobactéries entraînent des taux très élevés de céphalosporinases chez les *E.coli*, *Kl. pneumoniae* mais aussi chez les souches d'*Enterobacter* et de *Citrobacter*.

L'expression de cette céphalosporinase est médiée par le gène Amp-C, plus de 20 β -lactamases de type Amp-C différentes ont été retrouvées. Ceci entraîne une résistance de haut niveau aux β -lactamines. Seul la sensibilité à la céfépime et aux carbapénèmes est maintenue. Cette résistance est représentée chez certaines espèces en particulier : *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Serratia marcescens* et *Citrobacter freundii*.

5-4- Résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones (FQ)

Les mécanismes de résistance aux FQ sont de deux types :

-altération de la cible aux FQ.

-efflux avec diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique est l'expression d'une protéine acR par mutation du gène qui entraîne cet effet. [13]

5-5- *Acinetobacter baumannii* résistant à la ceftazidime et / ou l'imipinème (ABR) :

Acinetobacter baumannii représente 90 à 95% des *Acinetobacter* isolés en pathologie humaine, il représente de 2 à 4 % des bactéries responsables des IN, les ABR jouent un rôle croissant dans certains secteurs hospitaliers et sont souvent à l'origine des bouffées épidémiques.

Elle acquiert des caractéristiques de résistances aux ATB, elle produit l'enzyme β -lactamase à spectre élargi le rend résistante à toutes les β -lactamines (Gerard, 2011).

Les malades colonisés et/ou infectés constituent les réservoirs de ce germe, les sites habituels de fixation sont la peau, les voies respiratoires et digestives ; leur diffusion se fait par l'environnement (air, support solide ...) .La transmission est directe de patient à un autre ou indirecte à partir de support inerte et essentiellement manu portée par le personnel.

5-6-Entérocoques résistant à la vancomycine (ERV) :

Les Entérocoques représentent 5 à 8% des bactéries responsables des IN, le plus souvent de l'espèce *Enterococcus faecium*. La sélection de ce germe en milieu hospitalier à comme facteur de risque les traitements antibiotiques en particulier par glycopeptides, mais l'acquisition est aussi possible par la transmission croisée (Gerard, 2011).

5-7-Pseudomonas aeruginosa résistant à la ceftazidime et / ou l'imipineme (PARC) :

Les *Pseudomonas* notamment l'espèce *aeruginosa* est responsable d'infection nosocomiale résistant aux β -lactamines (tétracycline, ceftazidime ou l'imipineme) qui lui rend une souche très pathogène, ont tendance aussi d'être résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones (Gerard, 2011).

5-8-Bactéries productrices de carbapénémases

Des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* producteurs de carbapénémases peuvent être à l'origine d'infections nosocomiales graves et difficiles à traiter (Gerard, 2011).

1-Objectif de l'étude :

Ce travail qui était réalisée dans l'environnement hospitalier et sur des patients hospitalisés au niveau de 03 services de l'hôpital IBN ZOHR, GUELMA avait pour but d'isoler et d'identifier les germes bactériens résistants aux antibiotiques responsables d'infections nosocomiales. Le protocole de travail suivi est présenté dans la figure1.

2-Prélèvement et enrichissement :

Les sites ont été choisis dans le but de couvrir plus au moins l'ensemble de l'environnement du malade au sein des services : pneumo-ptisiologie, d'infectiologie et d'hémodialyse, les prélèvements réalisés sont:

2-1- Urine :

Le recueil d'urine se fait par voie naturelle selon la technique dite « milieu de jet » et selon des règles strictes qui conditionnent la qualité de l'étude cyto bactériologique des urines ECBU (Wilson, 2004).

2-2-Pus :

La plupart des prélèvements de pus se font soit par écouvillonnage à partir des sites infectés des malades hospitalisés, soit par des ponctions avec seringue stériles après désinfection du site de la plaie dans des conditions d'asepsie rigoureuse, leur enrichissement se fait dans du bouillon nutritif BHIB ou BGT et incubés à 37°c pendant 24 heures

2-3- Surface sèche :

Les écouvillons stériles utilisées pour prélever au niveau des surfaces sèches ont été humidifiées dans du bouillon nutritif BGT ou BHIB et incubés à 37°c pendant 24heures avant la réalisation du prélèvement par frottement au beau matin avant le nettoyage quotidien sur les sites intéressants : lit, table malade, adaptable, poignet de porte et robin et d'eau.

2-4 – Air (atmosphère hospitalier) :

Une boîte de gélose nutritive (GN) est exposée ouverte pendant une nuit (24h) à l'atmosphère aérienne de chaque service à une hauteur supérieur à un mètre.

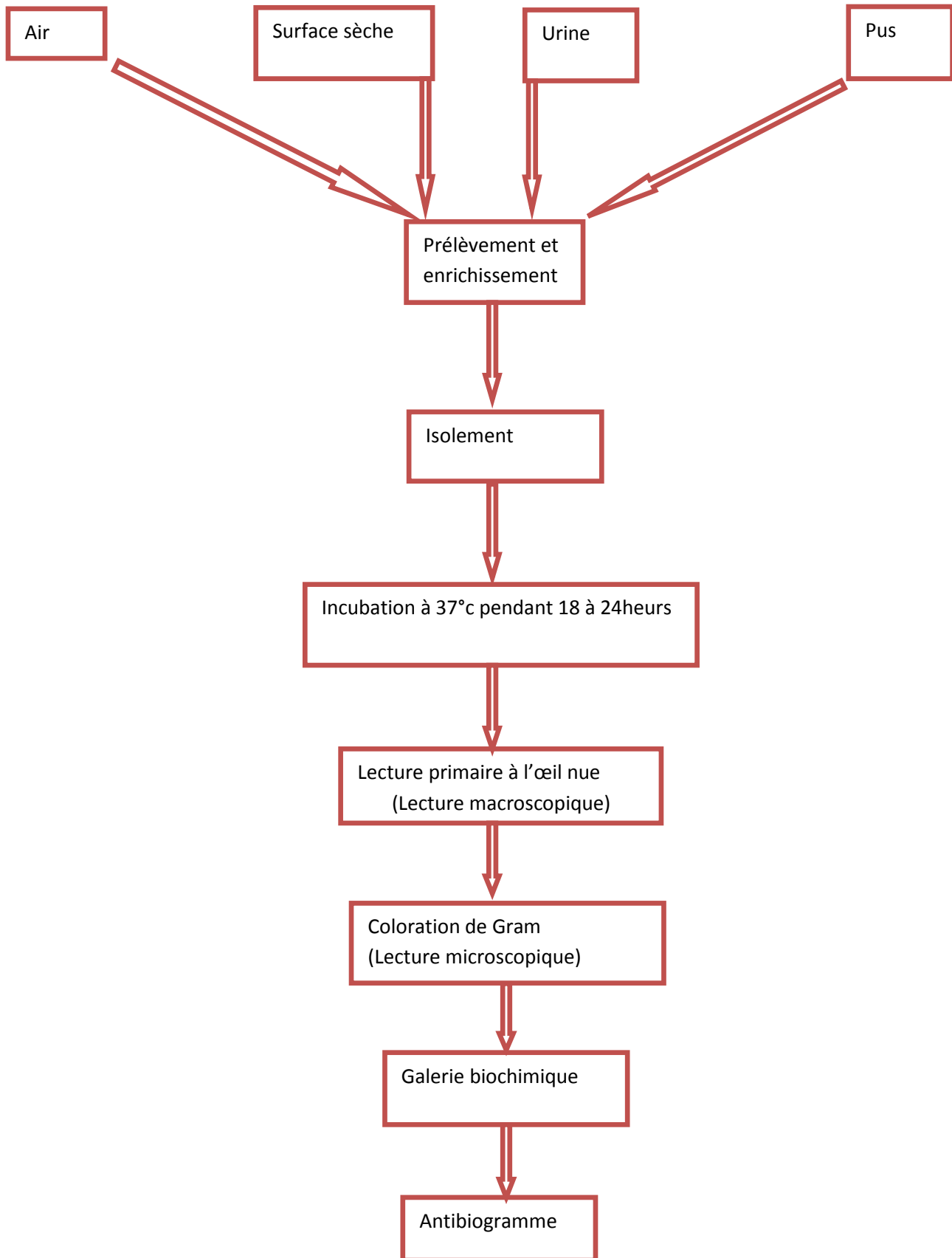


Figure1: Le protocole suivi pour l'étude bactériologique des différents prélèvements.

3- Isolement :

Après avoir reçus les différents prélèvements, on a effectué l'isolement sur différents milieu en fonction du type de prélèvement.

3-1- Urine :

L'isolement des germes contenus dans les urines se fait essentiellement sur les milieux :

- Gélose Nutritive (GN), par ensemencement en stries.
- Gélose Mac conkey (MC), par ensemencement en quadrants.

L'incubation de ces milieux se fait dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

3-2- Pus :

L'isolement de pus se fait sur :

- Gélose Mac conkey (MC).
- Gélose Chapman (CHAP).
- Gélose au sang frais (GSF).
- Gélose au sang cuit(GSC).

L'ensemencement sur ces milieux gélosé se fait par la méthode des quadrants et leur incubation dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

3-3- Surface sèche :

Après avoir fait les prélèvements des surfaces sèches, les écouvillons sont incubés à 37°C avant de faire leur ensemencement sur :

- Gélose nutritif (GN).
- Gélose mac conkey (MC).
- Gélose Chapman (CHAP).

L'ensemencement se fait par la méthode des quadrants et leur incubation à 37°C pendant 18 à 24h.

3-4- Air :

La boîte de GN qui a été ouverte pendant une nuit à l'atmosphère est incubée directement à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

4-Identification :

4-1-Identification macroscopique :

Après la culture bactérienne des germes, la lecture primaire est basée sur l'observation directe à l'œil nu des colonies : forme, couleur et odeur qui permettra d'orienter plus ou moins notre étude d'identification profonde vis-à-vis les germes étudiés théoriquement.

4-2- Identification microscopique :

L'étude microscopique a pour but de voir l'aspect des colonies au microscope optique. Il est important de noter qu'une étape de réisolement est faite après la culture et avant l'étude microscopique afin d'obtenir des souches pures facilitant leur étude par la suite.

4 -2- 1- Examen direct à l'état frais :

Cet examen concerne l'observation au microscope optique à l'objectif x40 :

- La cytologie des urines avant la culture: mettre une goutte d'urine entre lame et lamelle.

-L'état frais des colonies après la culture bactérienne de n'importe quel prélèvement.

4-2-2- Examen direct après coloration :

Cet examen consiste à préparer un frottis sur lame, des prélèvements reçus (pus) ou des colonies après la culture bactérienne et le colorer et l'observer au microscope optique à l'objectif x100, il ya deux types de colorations :

La coloration de Gram et la coloration au bleu de méthylène.

Préparation d'un frottis :

- Déposer une goutte d'eau stérile sur une lame propre.
- Faire étaler avec une anse de platine ou une pipette pasteur une goutte de prélèvement (pus) ou une colonie bactérienne sur la goutte d'eau de façon circulaire.
- Réaliser le frottis par un doux étalement.
- Sécher et fixer le frottis devant un bec bunsen.
- La méthode de chaque examen et leur but sont présentés dans le tableau1.

Matériel et méthodes

Tableau 1 : Les méthodes d'examen microscopique et leurs buts (Delaras,2008).

Type d'examen	Méthode de l'examen	But de l'examen
Examen direct a l'état frais	<ul style="list-style-type: none"> *Déposer une goutte d'eau distillée stérile sur une lame propre. *Prélever une fraction de colonie (ou une goutte de bouillon nutritif). *Faire une petite suspension sur la lame. *Mettre lamelle sur la lamelle. *Lecture au microscope optique x40. -Soit une goutte d'urine entre lame et lamelle. 	<ul style="list-style-type: none"> -Permet d'identifier la forme, la mobilité et le mode de groupement des bactéries. -Permet de voir la cytologie des urines
Examen direct au bleu de méthylène	<ul style="list-style-type: none"> * Coloration du frottis au bleu de méthylène pendant une minute. *Laver la lame avec l'eau de robinet. *Laisser sécher pendant un certain temps ou séché le entre 02papiers buvard. *L'observation au microscope optique à l'objectif x100 à l'aide d'huile à immersion. 	<ul style="list-style-type: none"> -Permet d'identifier l'analyse cytologique des prélèvements des pus avant leur culture prenant en considération : *la présence ou non des germes, leur forme et leur mode de groupement. *Présence des leucocytes : polynucléaire-Lymphocyte ou monocyte.
Examen direct à la coloration de Gram	<ul style="list-style-type: none"> Recouvrir le frottis avec le violet de gentiane pendant une minute. *Rincer avec l'eau de robinet *Recouvrir la lame ave du lugole pendant une minute. *Rincer à l'eau de robinet. *Verser l'alcool sur le frottis jusqu'à l'élimination du couleur. *Rincer à l'eau de robinet. *Ajouter la Fuschine pendant une minute *Rincer à l'eau de robinet *Laisser sécher la lame *Observer au microscope optique à l'objectif x 100 à l'aide d'huile à immersion de cèdre. 	<ul style="list-style-type: none"> *Permet d'identifier 02 types de germes : Gram positif de couleur violet foncé. Gram négatif de couleur rose. *Permet d'identifier la morphologie des germes : Cocci - Bacille - Coccobacille et leur mode de groupement

Matériel et méthodes

4-3- Identification biochimique :

4-3-1- Caractères biochimiques des entérobactéries :

A- Galerie classique biochimique :

Tableau 2 : Composition de la galerie biochimique classique

Milieu	Caractères recherchés	Mode d'ensemencement	Résultat attendu
Citrate de Simmons	- Le citrate est utilisé comme seul source de carbone	-L'ensemencement se fait sur la pente avec une strie longitudinale -Incubation à 37°C pendant 24h à l'étuve.	Virage de l'indicateur de pH au couleur bleu
Tri-sugar-iron : TSI	-Production du gaz -Production H ₂ S -Utilisation des sucres : *Glucose *Saccharose *Lactose	-L'ensemencement sur la surface de la pente par des stries serrées puis par piqure centrale du culot. -Incubation à 37°C pendant 24h à l'étuve.	-Virage de couleur vers le jaune. -Formation des taches noires. -Observation d'espace vide dans le milieu.
Clark et lubs	-Production de l'acétone -Mise en évidence de la voie des fermentations des acides mixtes par le test RM.	Réaliser une suspension (milieu liquide). Incubation à 37°C pdt 24h Test VP (Voges Proskauer) : *Ajouter 10 gouttes de VP1 (alpha naphthol) + 10 gouttes de VP 2 (Soude concentré ou potasse). -Laisser la réaction 10 minutes, puis la lecture. Test RM (rouge de méthylène): *Ajouter 2 à 3 goutte de rouge de méthyle. -La lecture est immédiate.	Test VP : * VP + : Rouge *VP _ : Jaune Test RM : *RM + : Rouge *RM _ : Jaune
Urée indole	-Formation d'indole -L'activité uréase.	-Réaliser une suspension (milieu liquide) -Incubation à 37°C pdt 24h -Test indole : ajouter quelque goutte de réactif Kovacs.	*Test urée : Apparition de couleur rose *Test indole : Apparition d'un anneau rouge à la surface.
Mannitol mobilité	-Mobilité. -Mannitol.	-L'ensemencement par piqure centrale. Incubation à 37°C pendant 24h	Mobilité : Les bactéries mobiles peuvent déplacer dans la gélose molle Caractère mannitol : milieu de couleur jaune

B- La galerie biochimique API 20 E :

- **Principe :**

L'API 20 E est un système standardisé pour l'identification des enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés.

Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Guy *et al.*, 1998 ; BioMerieux SA).

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

- **Mode opératoire :**

Test oxydase :

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21^{ème} test d'identification à noter sur la fiche de résultat.

L'oxydase ou Cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes.

La recherche de cette enzyme est utile dans le repérage des colonies des Neisseriaceae et dans le diagnostic des bacilles à Gram négatif (Delaras, 2008).

Pour les entérobactéries le test oxydase est négatif.

Préparation de la galerie :

-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

-Réaliser une suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur dans une ampoule d'API NaCl 0.85% ou une ampoule d'API suspension (5ml) ou utiliser un tube contenant 5ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile.

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie.
- Pour les tests : CIT- VP- GEL, remplir le tube et la cupule.
- Pour les autres tests remplir uniquement les tubes (non les cupules).
- Pour les tests : ADH- LDC- ODC -H₂S -URE, créer une anaérobiose en remplissant leur cupule avec l'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 18-24 h (Bio Merieux SA).

- **Lecture et interprétation :**

-Noter sur la fiche de lecture toute les résultats spontanés, puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

- Test TDA : ajouter 01 goutte de réactif TDA. Lecture immédiate.
- Test VP : ajouter 01goutte de VP1 et VP2. Attendre 10mn.
- Test IND: ajouter 01goutte de réactif James.

-L'identification est obtenue à profil numérique sur la fiche de résultat, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pou chacun, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe de la galerie les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7chiffres qui constituent le profil numérique.

-L'interprétation se fait à partir de la base de données :

*A l'aide du catalogue analytique : Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

*A l'aide du logiciel d'identification api web™ (figure2) : Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7chiffres (BioMerieux SA).

4-3-2-Caractères biochimiques des *Pseudomonas* :

A-Test Oxydase :

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, soit des disques prêts à l'emploi du commerce ou liquide appliquée sur papier buvard (Corvaglia, 2006).

Pour les *pseudomonas* le test oxydase est positif traduit par coloration bleu foncé.

B-Milieux sélectif des *Pseudomonas* :

L'ensemencement sur les milieux spécifique de King permet la différenciation des différents espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence des pigments spécifique : Milieu **King A** et milieu **King B** : des tubes gélosés solide prés à l'emploi se diffère par leur composition (Guillaume, 2004).

- **Principe :**

-Avec ance de platine stérile ou pipette pasteur, prendre quelque colonie de notre culture suspecte de *Pseudomonas* et réaliser des stries sur la surface des deux milieux :

King A : La présence d'ion inorganique sur ce milieu favorise la production de pyocyanine qui un caractère spécifique au *Pseudomonas aeruginosa*.

King B : leur teneur élevée en phosphate permet la production de pyoverdine (Ould Brahim Elkory, 1998).

-Incubation à 37°C pendant 18 à 24h

Matériel et méthodes

-L'apparition d'une couleur sur le milieu peut diffuser sur la pente traduit la présence des pigments diffusibles :

***King A** : Couleur Bleu (présence de pyocyanine).

***King B** : couleur jaune- vert fluorescent sous UV (présence de pyoverdine).

C- La galerie API 20 NE :

- **Principe :**

L'API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*...), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation et une base de données.

Elle comporte 20 micros tubes contenant des substrats déshydratés.

*Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline (du NO₃ à PNPG).

*Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum (du GLU à PAC) (Guy *et al.*, 1998 ; Bio Merieux SA).

- **Mode opératoire :**

-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

-Réaliser une suspension bactérienne avec une ampoule d'API Na Cl 0.85 % Medium (2ml) ou utiliser un tube contenant 2ml de solution saline à 0.85 % sans additif.

-Remplir les tubes des tests : NO₃ à PNPG avec la suspension précédente en utilisant pipette pasteur en évitant la formation des bulles d'air.

-Ouvrir une ampoule d'APIAUX Medium et y transférer environ 200µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette pasteur.

-Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC.

-Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests : GLU- ADH- URE.

-Refermer la boîte et incuber à 29°C ±2°C pendant 24h 5 (Bio Mériex SA).

- **Lecture et interprétation :**

Noter sur la fiche de résultat toutes les réactions spontanées : GLU-ADH -URE -ESC- GEL - PNPG.

La révélation des 02 tests NO₃ et TRP doit se faire à l'abri d'une contamination par l'air.

➤ Test NO₃ : ajouter 1 goutte NIT1 et NIT2

➤ Test TRP : ajouter 01 goutte de James (le rouge indique la réaction positive)

-L'identification est obtenue à profil numérique sur la fiche de résultat, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe de la galerie les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.

-L'identification se fait à partir de la base de données :

*A l'aide du catalogue analytique : Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

*A l'aide du logiciel d'identification *apiweb*TM : Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres (Bio Merieux SA).

4-3-3- Caractères biochimique des Staphylocoque :

A-Test catalase :

L'obtention d'une culture de cocci Gram positif nous permettra de faire le test catalase pour différencier les *Staphylocoques* des *Streptocoques*.

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage. (Delaras, 2008).

- **Principe :**

-Mettre une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 sur une lame propre et sèche.

-Prendre une colonie bien isolée avec pipette pasteur et la mettre sur la goutte d' H_2O_2 .

-La lecture est immédiate à l'œil nu :

*Catalase+ : formation des bulles indique la bactérie possède l'enzyme de catalase.

*Catalase- : aucune bulle est formée indique que la bactérie n'a pas l'enzyme de catalase.

B- Test Mannitol :

La fermentation du mannitol par les Staphylocoques pathogènes se traduit par un virage de couleur du milieu Chapman vers le jaune après leur incubation à 37°C pendant 18-24h.

C- Test Coagulase :

Ce test permet de différencier entre les *Saphyloococcus aureus* et les autres genres des *Staphylocoques*.

Principe :

-Introduire 10 gouttes de plasma de lapin dans un tube à hémolyse stérile.

-Faire une suspension avec les bactéries de *Staphylocoque* à partir d'une culture pure d'un milieu gélosé ou bouillon nutritif.

-Incubation à 37°C pendant 2h jusqu'à 18h.

Matériel et méthodes

-L'observation d'une masse coagulée occupe plus de trois quarts du volume de tube indique la réaction est (+) et leur absence indique que la coagulase est négative (Carbonnelle, 1987).

Tableau 03 : Caractéristiques des souches de Staphylocoque les plus fréquemment isolées (Carbonnelle, 1987)

Staphylocoque	<i>Aureus</i>	<i>Epidermidis</i>	<i>saprophyticus</i>	<i>intermedius</i>
Catalase	+	+	+	+
Mannitol	+	-	-	-
Coagulase	+	-	-	-

D- La galerie biochimique API Staph :

- **Principe :**

L'Api Staph est un système standardisé pour l'identification des genres : *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria*, comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données.

La galerie API Staph comporte 20 micros tubes contenant des substrats déshydratés, les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne.

Les réactions produites pendant l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactif (Guy *et al.*, 1998 ; Bio Merieux SA).

- **Mode opératoire :**

-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

-Réaliser une suspension de 0.5 Mc Farland des colonies dans une ampoule d'API Staph Medium.

-Remplir à l'aide d'une pipette pasteur les tubes de la galerie avec la suspension précédente.

-Créer une anaérobiose pour tests ADH et UREE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

-Renfermer la boîte et l'incuber à 37°C pendant 24h (Bio Merieux SA).

- **Lecture et interprétation :**

Lire les réactions conformément au tableau de lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivant :

- Test VP : VP1 et VP2 (10minutes), le rose franche ou violet indique une réaction positive, mais le rose pale (clair) indique une réaction négative.
- Test NIT : NIT1 et NIT2 (10minutes), le rouge indique une réaction positive.
- Test PAL : ZYM A et ZYM B (10minutes), le violet indique une réaction positive.

-L'identification est obtenue à profil numérique sur la fiche de résultat, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe de la galerie les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7chifres qui constituent le profil numérique.

-L'interprétation se fait à partir de la base de données :

*A l'aide du catalogue analytique : Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

*A l'aide du logiciel d'identification api web™ : Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7chiffres (BioMerieux SA).

5- Antibiogramme :

- **But :**

L'antibiogramme est une étape très importante qui suit une culture pure des bactéries avec leur l'identification responsable d'infection, elle permet d'étudier la sensibilité ou la résistance des souches vis à vis un certain nombre d'antibiotique précis pour chaque types.

- **Principe :**

-La méthode d'antibiogramme utilisé dans notre étude c'est la méthode de diffusion classique de disque sur gélose (Delarras, 1998).

-L'antibiogramme permet une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier.

-Pour réaliser cette technique on utilise un milieu de Muller Hinton (MH) standardisé pour toutes les bactéries sauf quelques souches exigeantes.

-Les disques pré imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose MH après son inoculation par la souche étudiée.

-Après l'incubation de la boite les disques d'antibiotique vont diffusés dans MH en créant un gradient de concentration minimal inhibitrice apparait par des zones circulaire.

- **Préparation de l'inoculum :**

-A partir d'une culture pure bactérienne réaliser une suspension microbienne d'opacité équivalente au point 0.5 de Mac Farland on utilisant des colonies isolés dans l'eau physiologique 10 ml.

- L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15min qui suivent sa préparation.

-Frotter l'écouvillon sur la totalité gélosé de MH de haut en bas en stries serrés.

-Cette opération doit être répétée 2-3 fois en tournant la boite à 60°C (trois directions) où il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (CA-SFM, 1998).

- **Application des disques d'antibiotiques :**

-L'application des disques se fait à l'aide de distributeur spécifique aux antibiotiques ou avec un pince stérile (Figure 3).

-Dans chaque boite il faut mettre au moins 06 disques pour les boites de 90mm(Figure4),

12disques pour les boites de 150mm et 16 disques pour les boites carrées de 120mm de coté.

-Chaque type de bactériens possède une liste d'antibiotique précis avec une charge en µg (concentration) spécifique (Delarras, 1998).

-Une fois les disques sont déposés, il ne faut pas les déplacés car leur diffusion est très rapide.

-Incubation de la boite gélosé de MH se fait à l'étuve à 37°C pendant 18- 24h.

- **Lecture et interprétation:**

-Après la culture bactérienne avec les antibiotiques, des zones d'inhibitions de croissance vont apparaître dans la boite de MH.

-Mesurer avec précision les diamètres d'inhibition au millimètre à l'aide d'une règle.

-Selon les diamètres de concentration critique européenne des antibiotiques et à l'aide d'un logiciel Wonnet5 ,3 d'interprétation (figure5) on peut classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible- Résistant –Intermédiaire.

*Lorsque le diamètre de la souche testé est plus grand que le diamètre critique, on déclare que la souche est **sensible (S)**.

*Lorsque le diamètre de la souche testé est plus petit que le diamètre critique, on déclare que la souche est **résistante(R)**.

* Lorsque le diamètre de la souche testé est égal au diamètre critique, on la déclare que la souche comme étant **intermédiaire(I)** (Delarras,1998).

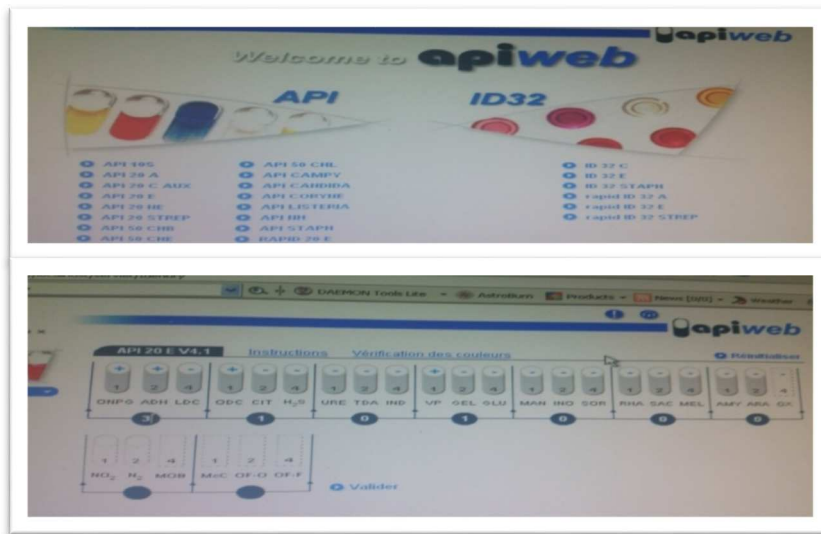


Figure 2 : Photo d'un logiciel API Web installé au niveau de laboratoire



Figure 3 : Réalisation d'un antibiogramme



Figure 4 : Distribution des antibiotiques sur la boîte de MH

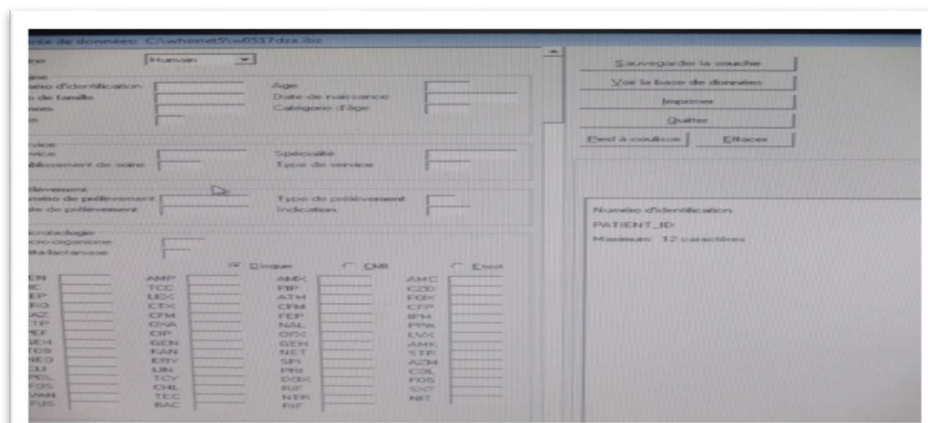


Figure 5 : Photo d'un logiciel wonnet 5,3 installé au niveau de laboratoire

6- Test complémentaire :

6-1- Test de détection du SARM:

- **Principe :**

La détection des SARM avec le réactif : « SLIDEX MRSA Detection », est un test rapide d'agglutination de particules de latex qui permet la détection de la résistance à la méticilline des souches des *Staphylococcus aureus* par la mise en évidence de la PBP2 (penicillin-binding protein 2) qui un produit d'extraction du gène codant pour la résistance à la méticilline (MecA) (BioMerieux SA).

-Mettre 4gouttes du réactif d'extraction 1 (R3) dans un tube pour micro centrifugeuse.

-Prendre des colonies isolés avec des oeses de microbiologie stériles et les mettre dans le tube à centrifugé contient du R3.

-Boucher le tube et le mettre au bain marie bouillant ou sur le bloc chauffant à une température (t°) de 95° à 100°C pendant 03minutes.

-Retirer le tube et laisser le refroidir à t° ambiante.

-Ajouter une goutte de réactif d'extraction R4 et bien homogénéiser le tube.

-Centrifuger à 1500 g pendant 05 minutes.

-Dans la carte d'agglutination, mettre en deux cercle une goutte d'échantillon (50 µl)

*L'un pour tester le latex sensibilisé R1.

*Et l'autre pour tester le latex control négatif R2(Bio Merieux SA)..

- **Lecture :**

- Agglutination avec R1 et pas d'agglutination avec R2 : positif signifie la présence de PBP2.

-Pas d'agglutination ou très fine granulation avec l'un des deux tests : Négatif signifie l'absence de PBP2.

-Agglutination avec le latex control négatif R2 : Résultat ininterprétable (BioMerieux SA).

6-2- Test double disque (test de synergie) :

- **Principe:**

-Réaliser un inoculum d'antibiogramme de la souche à tester (qui ne présente pas l'image de synergie sur l'antibiogramme).

-La recherche de BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme.

-Ensemencer avec de l'écouvillon sur la boîte MH la suspension de la souche à tester.

-Déposer un disque d'AMC à 30mm centre à centre d'un disque de CTX ou CRO.

-Incuber pendant 30 minutes à 37°C dans l'étuve.

-Ressortir la boîte après ce temps et enlever le disque d'AMC et remplacer le par l'antibiotique CTX.

-Incubation à 37°C pendant 18- 24heurs. (CA-SFM, 1998).

- **Lecture :**

Lecture de diamètre autour des deux disques de CTX montre que le disque initial présente un diamètre réduit c'est-à-dire la souche résistante, alors que le deuxième CTX qui est met à la place de l'AMC présente un diamètre important de sensibilité qui explique le phénomène de synergie entre CTX et AMC avec l'image de bouchon de champagne (Rahal,2005).

Résultats et Discussion

Les résultats de notre étude qui est basée sur l'isolement et l'identification des bactéries multi résistantes aux antibiotiques (résistance acquise à plusieurs antibiotiques) sont présentés pour chaque type de prélèvement.

1-Urine (ECBU) :

1-1-Observation avant culture :

Les résultats sont obtenus à partir de l'analyse cyto bactériologique des urines des malades hospitalisés dans les services d'infectiologie et de pneumo-phtisiologie, après leur admission de plus de 02jours.

1-1-1- Macroscopique :

L'étude macroscopique des urines étudiées avant leur culture est présentée dans le tableau 4.

Tableau 4 : Aspect macroscopique des urines des malades hospitalisés

Numéro de prélèvement	Age (ans)	Service d'hospitalisation	Aspect macroscopique
01	64	Infectiologie homme	Légèrement trouble
02	45	Infectiologie femme	Légèrement trouble
03	79	Phtisiologie homme	Trouble
04	62	Phtisiologie femme	Hématique
05	54	Infectiologie femme	Légèrement trouble
06	40	Infectiologie homme	Clair
07	66	Infectiologie homme	Clair
08	54	Infectiologie femme	Légèrement trouble
09	78	Infectiologie homme	Trouble
10	73	Phtisiologie femme	Trouble

1-2-1-Microscopique (la cytologie):

L'aspect microscopique des urines avant leur culture est présentée dans le tableau 5 et figure6.

Résultats et Discussion

Tableau 5 : Aspect microscopiques des urines.

Numéro de prélèvement (urine)	Aspect microscopique
01	Leucocyte(+), bacille(+)
02	Rares leucocyte
03	Bacilles (++)
04	Hématies (+4), leucocytes (++) , bacilles (+++)
05	Dépôt d'urate amorphe
06	Bacille (+)
07	Rares Bacilles
08	Bacilles (+), leucocyte (rares)
09	Hématies(+), leucocytes (+++), rares Bacilles
10	Hématies (++) , rares leucocytes

1-2-Observation après culture :

1-2-1-Macroscopique :

L'aspect macroscopique des colonies après culture est présenté dans le tableau 6 et figure 7, 8et 9.

Tableau 6 : Aspect macroscopique des colonies a partir des urocultures sur GN et MC

N° de prélèvement	Gélose Nutritive	Mac Conkey
01	Petites, rondes et beige	Petites, rondes et rose
02	Grosses, bambées et muqueuses	Grosses, bambées et rose clair
03	Petites, rondes et beige	Petites, rondes et rose
04	Petites, rondes et beige	Petites, rondes et rose
05	Petites, rondes blanches	Aucune pousse
06	Grosses, bambées et muqueuses	Grosses, bambées et rose clair
07	Grosses, bambées et muqueuses	Grosses, bambées et rose clair
08	Petites, rondes et beige	Petites, rondes et rose
09	Grosses, plates, et de couleur verte.	Grosses, plates, et de couleur verte.
10	Grosses, plates , et de couleur verte.	Grosses, plates, et de couleur verte.

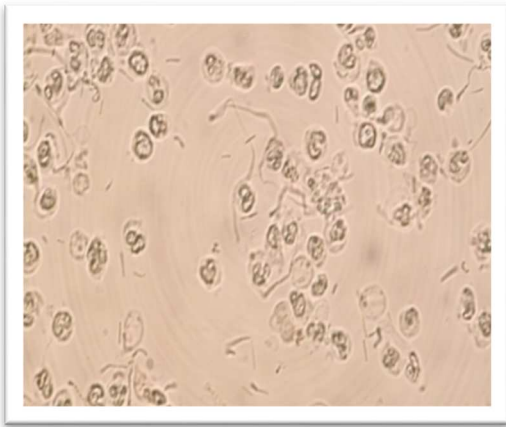


Figure 6: Aspect microscopique des urines



Figure 7 : aspect macroscopique des souches entérobactéries sur GN

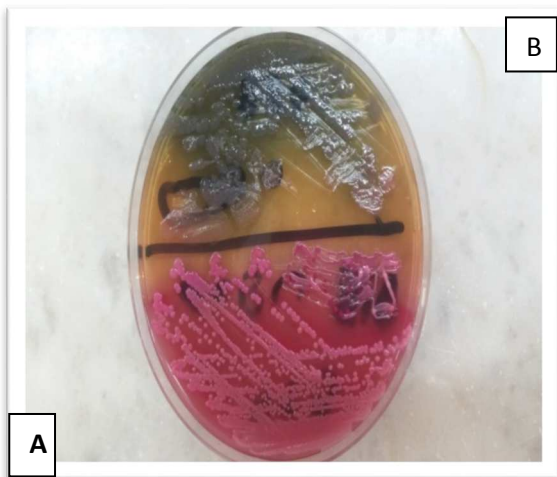


Figure 8: Aspect macroscopique des souches entérobactéries (A) et non entérobactéries sur MC (B)



Figure 9 : Aspect macroscopique du *Pseudomonas aeruginosa* sur GN

Résultats et Discussion

1-2-2- Microscopique :

Les résultats de l'aspect microscopique des colonies sont présentés dans le tableau 7 et les figures 10 et 11.

Tableau 7 : Résultat de l'examen microscopique des différents urocultures.

N° de prélèvement (urine)	Etat frais	Coloration de Gram
01	Bacille mobile	Bacille Gram négatif
02	Bacille mobile	Bacille Gram négatif
03	Bacille mobile	Bacille Gram négatif
04	Bacille mobile	Bacille Gram négatif
05	Court bacille mobile	Coccobacille Gram négatif
06	Bacille mobile	Bacille Gram négatif
07	Bacille mobile	Bacille Gram négatif
08	Bacille mobile	Bacille Gram négatif
09	Bacille très mobile	Bacille Gram négatif
10	Bacille très mobile	Bacille Gram négatif

- **Test oxydase :**

Le test oxydase est réalisé sur un papier buvard avec le réactif liquide d'oxydase .

Ce test permet de différencier dans les bacilles Gram négatif les entérobactéries des non entérobactéries et les résultats obtenus sont les suivants :

-Les prélèvements 1, 2, 3, 4, 6, 7 et 8 sont Oxydase négatif (-), donc il s'agit d'entérobactéries. (Figure 12).

-Les prélèvements 5, 9 et 10 sont Oxydase positif (+), donc il s'agit de bacilles Gram (-) non entérobactéries. (Figure 13)

1-3-Résultats de l'identification :

1-3-1-Entérobactéries :

- **Résultat de la galerie API 20E :**

Pour les prélèvements 1, 2, 3, 4, 6, 7 et 8 on a réalisé le système API 20E. Les résultats sont présentés dans le tableau 8 et figure 14.

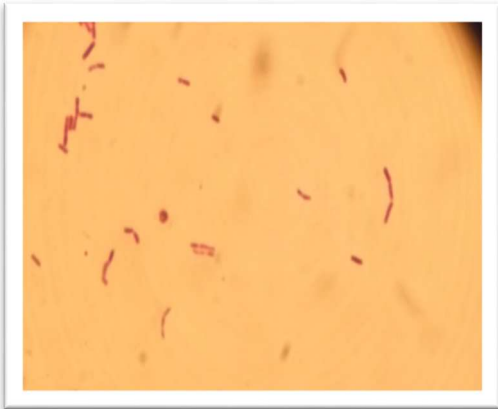


Figure 10 : Aspect microscopique des bacilles Gram négatif BGN

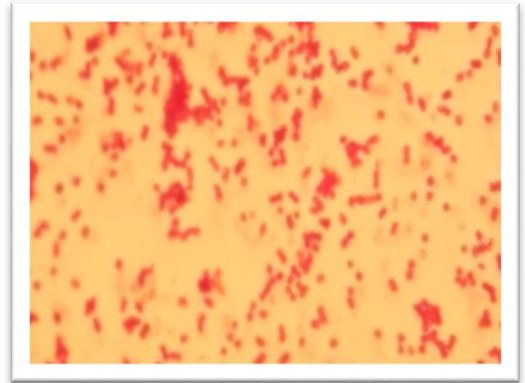


Figure 11 : Aspect microscopique des coccobacilles Gram négatif

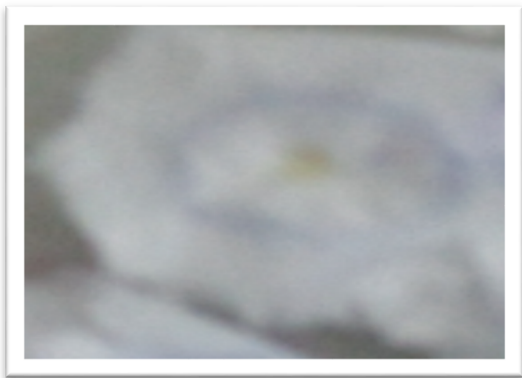


Figure 12: Test oxydase négatif pour BGN fermentaire



Figure 13: Test oxydase + pour les BGN non fermentaire



Figure 14 : Identification des entérobactéries BGNf avec le système API20E (souches des urines)

Résultats et Discussion

Tableau 8 : Résultat de la galerie biochimique API 20^E(urine)

Numéro de prélèvement (urine)	Code de l'API 20E	Germe identifié
01	5044553	<i>E. coli</i>
02	5214773	<i>Kl. P</i>
03	4144552	<i>E. coli</i>
04	5146572	<i>E. coli</i>
06	5214773	<i>Kl. P</i>
07	526772	<i>Kl. Oxytoca</i>
08	5064553	<i>E. coli</i>

1-3-2- Non entérobactéries :

➤ Résultat de la galerie API 20 NE :

Pour les prélèvements 5, 9 et 10, on a utilisé le système API 20 NE qui permettra d'identifier ce type de germe. Les résultats sont présentés dans le tableau 9 et figure 15.

Tableau 9 : Résultat de la galerie biochimique API NE(urine)

Numéro de prélèvement	Code de l'api NE	Germe identifié
05	0004042	<i>Acinetobacter baumannii</i>
09	2206002	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10	1354575	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

1-3-3- Milieux sélectifs des *Pseudomonas*:

Pour les prélèvements 9 et 10 l'ensemencement des colonies de *Pseudomonas* sur les milieux de King A et King B donne une couleur bleu vert sur le king A qui indique la présence de pyocyanine et une couleur jaune sur le King B indiquant la présence de pyoverdine (figure16).

1-4- Résultat de l'antibiogramme :

Les résultats des antibiogrammes effectués à partir des dix urocultures positives sont mentionnés dans le tableau 10.



Figure 15: Résultat de l'identification avec le système APINE pour les EBGNnf (souche 5, 9 et 10 des urines)

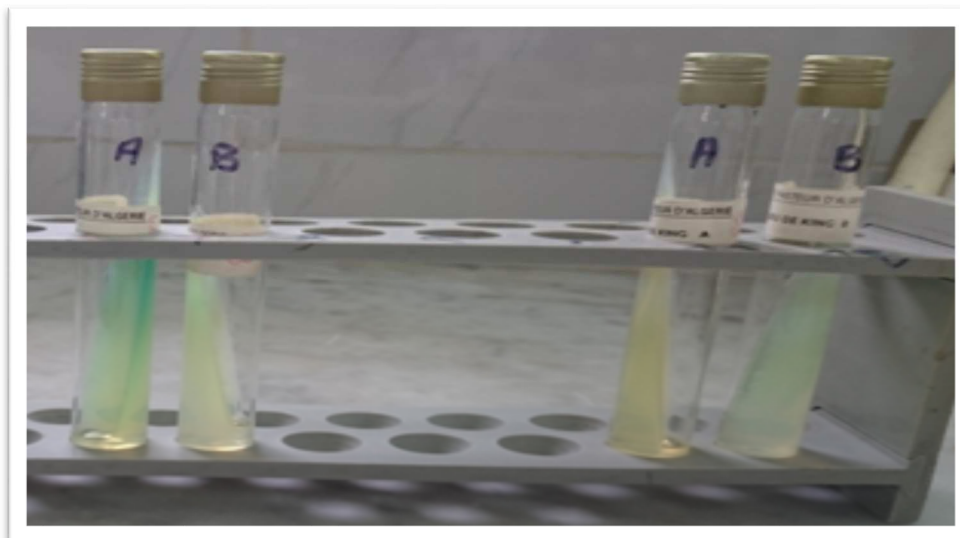


Figure16 : Résultat de la culture des *Pseudomonas* a partir des prélèvements des urines 9et 10 sur milieu King A et King B

Résultats et Discussion

Tableau 10 : Résultats de l'antibiogramme des germes isolés a partir des urines.

Germe identifié	Amc	Cz	Cro	Etp	Ctx	Amp	Fox	Tc _c	Ipm	Tic	Caz	Tmn	Akn	Do	Cip	Col	Gmn	Fsf
<i>E. coli</i> <i>BLSE+</i>	S	R	R	S	R	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kl. P</i> <i>BLSE+</i>	I	R	R	S	R	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E coli</i> <i>BLSE +</i>	R	R	R	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E coli</i> <i>BLSE +</i>	R	R	R	S	R	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acineto-</i> <i>bacter</i> <i>baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	-
<i>Kl.p</i> <i>BLSE +</i>	R	R	S	I	S	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kl. oxytoca</i>	R	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E coli</i> <i>BLSE +</i>	R	R	R	S	R	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	S	R	S	-	R	S	R	R
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	S	I	S	S	S	S	-	S	S	I	R

S: sensible R: resistant I: intermediare -: non testé.

D'après la lecture de l'antibiogramme et l'interprétation des diamètres mesurés sur un logiciel de Wonnet 5.3, les prélèvements étudiés montrent la présence de plusieurs bactéries multi résistantes vis-à-vis quelques antibiotiques de la famille des β -lactamines :

-EBLSE (*E. coli* et *kl.p*) où les bactéries sont résistantes aux Ctx et Cro avec une image de synergie entre un de ces 02 antibiotiques avec l'Amc, un système de résistance par la synthèse d'enzyme de β -lactamases (figure17)

-Une *Kl .p oxytoca* présentes un phénomène de multirésistance , plus de leurs résistances au β -lactamines CTX et AMC et CRO ,elle est résistante à l'Etp.

-*Acinetobacter baumannii* résistant à tous les β -lactamines testés (Tcc,Tic et Ipm),et résistant aussi au aminosides(Gmn et Kmn) donc il s'agit d'une souche bactérienne multi résistante qu'on qualifie de BMR(figur18).

-*P. aeruginosa* résistant l'Ipm, Caz ,Tic et Tcc qui sont des β -lactamines (figure 19).

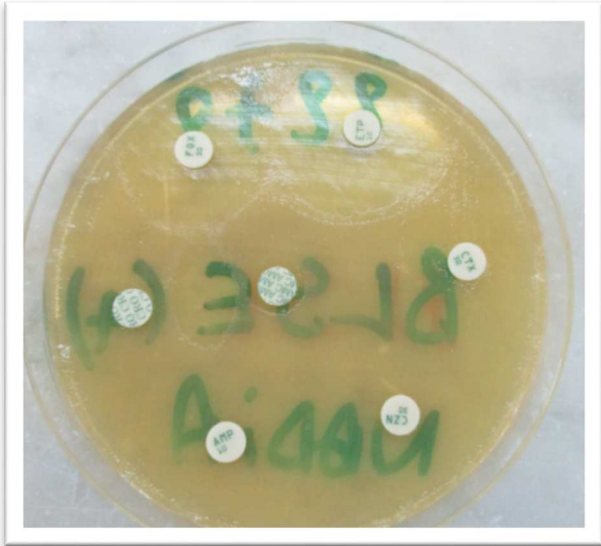


Figure 17 : Antibiogramme d'*E. coli* avec image de synergie



Figure18 : Antibiogramme d'un *Acinetobacter baumannii* BMR

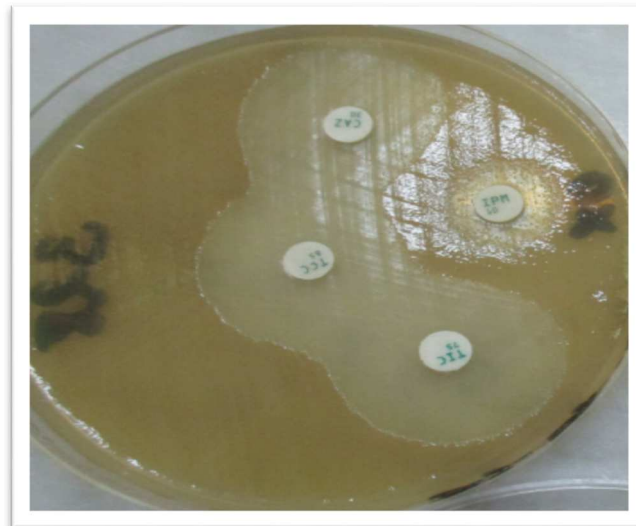


Figure 19 : Antibiogramme d'un *Pseudomonas aeruginosa*

Résultats et Discussion

La répartition de ces bactéries multi résistantes selon leur fréquence dans les urines est présentée dans la figure 20.

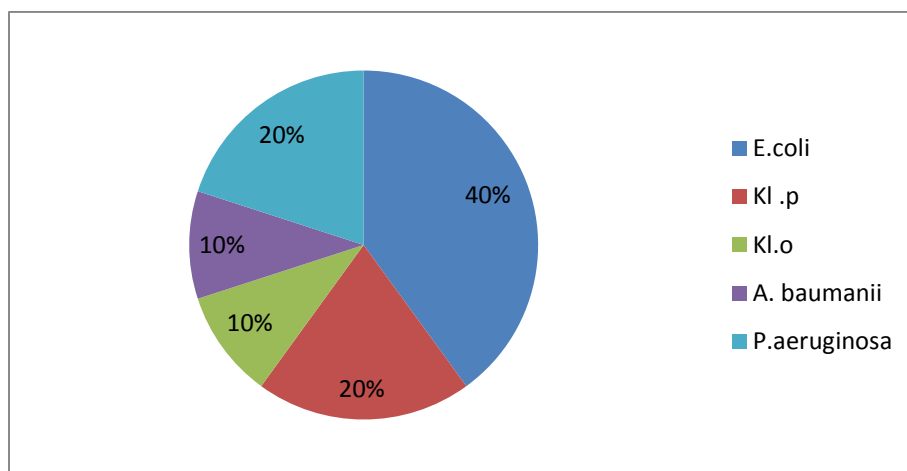


Figure 20: Répartition des bactéries multi résistantes isolées a partir des urines selon leurs fréquences

2- Pus :

Parmi les prélèvements de pus réalisés au niveau de service d'infectiologie, on a isolé des bactéries résistantes aux antibiotiques de 03 prélèvements.

2-1-Observation avant culture :

2-2-1-Examen microscopique à la coloration de bleu de méthylène :

Faire un frottis de chaque prélèvement reçu et le colorer au bleu de méthylène, les résultats sont présentés dans le tableau N° 11 et figure 21.

Tableau 11 : Résultats de l'examen microscopique au bleu de méthylène

N° de prélèvement	Service	Age (ans)	Examen microscopique directe)
Pus 01	Infectiologie homme	32	Polynucléaire (++)
Pus 02	Infectiologie homme	56	RAS (Avec rare lymphocytes)
Pus 03	Infectiologie femme	47	Polynucléaire (+)

2-2-Observation après culture :

2-2-1- Macroscopique :

Après la culture bactérienne des 03 pus, l'aspect macroscopique des colonies est présenté dans le tableau 12 (figure22).

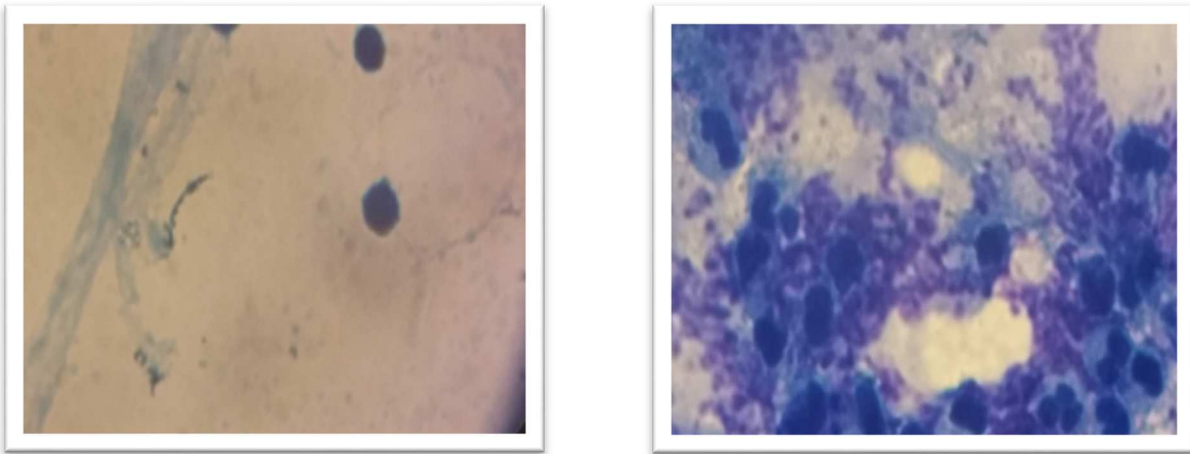


Figure 21 : Aspect microscopique de pus 1 et 2 avant culture

(Coloration de bleu de méthylène)

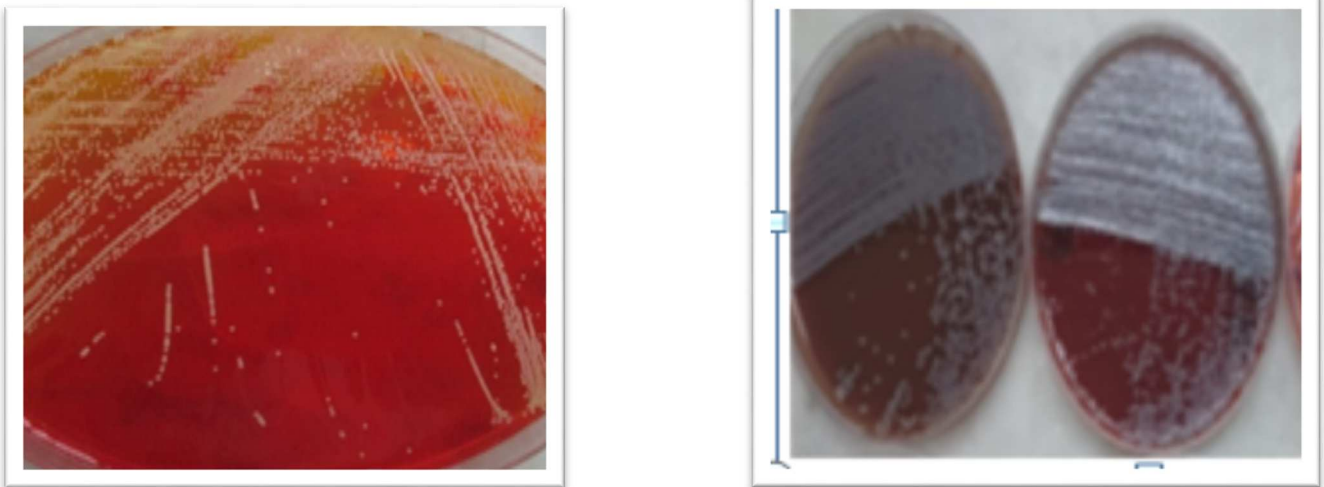


Figure 22 : Aspect macroscopique des colonies de Staphylocoque sur

CHAP , GSC et GSF

Tableau 12 : Aspect macroscopique des colonies après la culture des pus

	GSC	GSF	MC	CHAP
Pus 01	Petites, rondes et doré	Petites, rondes et beige	Aucune pousse	Petites, rondes et jaune doré
Pus 02	Grosses, blanches muqueuses	Grosses, blanches muqueuses	Grosses, rose clair et muqueuses	Aucune pousse
Pus 03	Petites, rondes et doré	Petites, rondes et beiges	Aucune pousse	Petites, rondes et jaune doré

2-3-2-Microscopique:

L'observation microscopique des colonies à l'état frais et à la coloration de Gram montre le résultat présenté dans tableau 13(figure 23).

Tableau 13 : Résultat de l'examen microscopique des pus.

	Examen à l'état frais	Examen à la coloration de Gram
Pus 01	Coccis mobiles	Coccis Gram positif
Pus 02	Bacilles mobiles	Bacilles Gram négatif
Pus 03	Coccis mobiles	Coccis Gram positif

2-3- Résultat de l'identification :

-Pour les prélèvements, 1 et 3 qui sont des coccis Gram positif (figure23) on leur réalise le test catalase sur une lame avec de H₂O₂ pour différencier les staphylocoques des streptocoques et les résultats obtenus sont les suivant :

*Les prélèvements 1et 3 sont catalase (+), donc il s'agit des Staphylocoques (figure 24).

-Pour différencier les *staphylococcus aureus* des autres *staphylococcus* on teste le coagulase et le résultat obtenue est un coagulase + (figure 25), et leur identification avec le système API STAPH (figure 26).

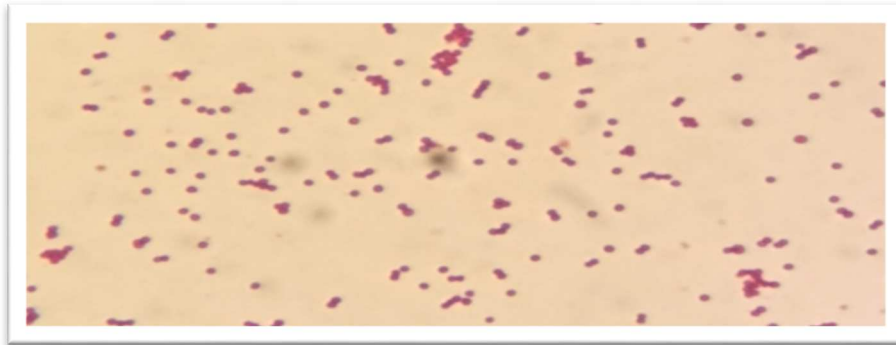


Figure23 : Aspect au microscopique des cocci Gram positif



Figure24 : Résultat du test catalase + pour les pus 1 et 3



Figure 25: Résultat du test coagulase + pour les *Staphylocoques aureus* des pus 1et 3



Figure26 : Résultat de l'identification avec le système d'API STAPH pour les Staphylocoque (pus 1et 3)

Résultats et Discussion

-Pour le prélèvement 2 qu'il s'agit des BGN, on teste l'oxydase pour différencier les entérobactéries des non entérobactéries, le résultat obtenu est :

*Une oxydase négatif (figure 12) donc il s'agit d'un germe appartenant à la famille des entérobactéries, et leur identification avec le système API 20 E.

Les résultats obtenus dans le tableau 14.

Tableau 14 : Résultat de la galerie API 20E et API STAPH (pus)

Numéro de prélèvement	Code API20 E	Code APISTAPH	Germe identifié
Pus 01	-----	6736153	<i>Staphylococcus aureus</i>
Pus 02	5214773	-----	<i>Kl.pneumoniae</i>
Pus 03	-----	676153	<i>Staphylococcus aureus</i>

2-4-Résultat de l'antibiogramme :

Les résultats d'antibiogrammes effectués sur les trois cultures des pus sont mentionnés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Résultat de l'antibiogramme de l'ECB des pus

Germe identifié	Amc	Cz	Cro	Etp	Ctx	Amp	Fox	OX	L	E	PT	Kmn
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	R	R	S	S	S	R
<i>Kl. P BLSE+</i>	S	R	R	S	R	R	S	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	R	R	S	S	S	R

S: sensible R: résistant -: non testé

Les résultats d'antibiogrammes des pus présentent des souches bactériennes multi résistantes aux antibiotiques.

-Une *Kl .p* BLSE résistante aux Cz, Ctx, Cro et Amp (β -lactamines).

Résultats et Discussion

-Deux souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à l'Ox et Fox (les méticillines), il s'agit des SARM, les souches pathogènes de *Staphylococcus aureus* présentes dans le pus sont devenues un problème majeur dans l'hôpital surtout ceux qui sont résistantes aux antibiotiques notamment à la famille des méticillines, cette résistance peut être détecté par un test complémentaire de « SLIDEX MRSA Detection », et le résultat obtenu :

*Une agglutination avec le réactif R2 donne une signification positive du test c'est-à-dire les *Staphylococcus aureus* sont des souches dite SARM (figure 27).

La répartition des bactéries isolés a partir des pus étudiés est présentée dans la figure 28 .

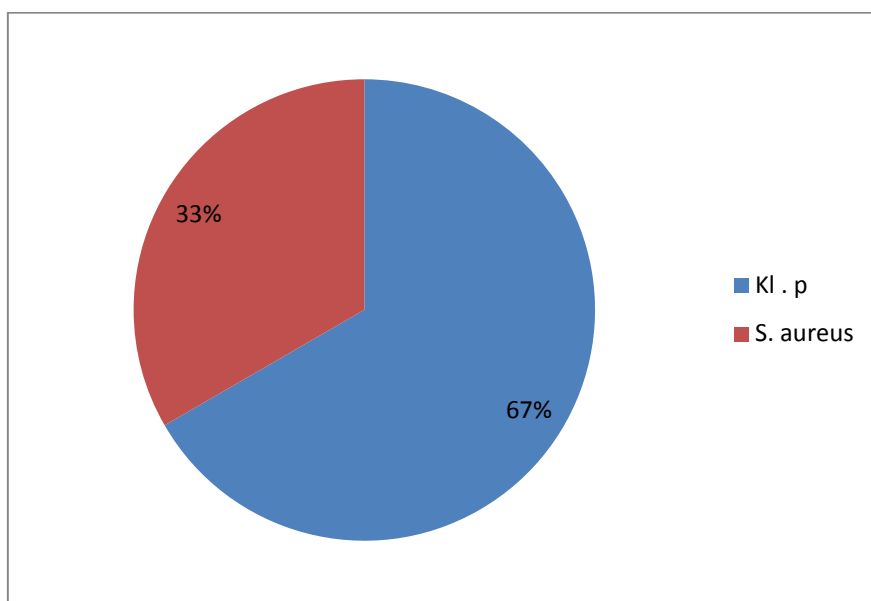


Figure 28 : Répartition des bactéries isolés a partir de l'ECB des pus selon leurs fréquences

3- Surface sèche :

Plusieurs prélèvements de surface sont faits (250 prélèvements) sur les différents sites mentionnés auparavant. On a sélectionné seulement les germes résistants aux antibiotiques.

3-1-Observation après culture :

3-1-1-Macroscopique :

- seuls les BHIB qui présentent un trouble sont ensemencés en vue d'un isolement.

-Après la culture bactérienne l'aspect macroscopique des colonies est présenté dans le tableau 16.

Résultats et Discussion

Tableau 16: Aspect macroscopique des souches isolées au niveau des différents sites.

Service	Site de prélèvement	GN	MC	CHAP
Pneumo-phtysiologie homme	Poignet lingerie	Petites et blanches	Petites, bombées et rose clair	Aucune pousse
Infectiologie homme	LIT 15	Grosses, bombées et muqueuses	Grosses, bombées, rose clair, muqueuses	Aucune pousse
Infectiologie femme	Table malade 03	Petites, bombées et blanches	Petites, bombées et rose clair	Aucune pousse
Infectiologie femme	Robinet toilette : 03	Grosses, bombées et muqueuses	Grosses, bombées, rose clair, muqueuses	Aucune pousse

3-1-2- Microscopique :

L'état frais des colonies trouvés et leurs colorations de Gram montrent que ces colonies sont tous des bacilles mobiles Gram négatif.

3-2-Identification :

Un système d'API 20E est réalisé sur les 04 prélèvements qui sont des bacilles Gram négatif et oxydase négatif (figure 29). Les résultats d'identification sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Résultat de la galerie biochimique API 20E (surface)

Site de prélèvement	Service	Germe identifié
Poignet lingerie	Pneumo-phtysiologie homme	<i>Citrobacter koseri</i>
LIT 15	Infectiologie homme	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Table malade N°03	Infectiologie femme	<i>Enterrobacter sakazaki</i>
Robinet toilette N°03	Infectiologie femme	<i>Klebsiella pneumoniae</i>



Figure 27 : Résultat positif pour la détection du SARM du pus 1et 3

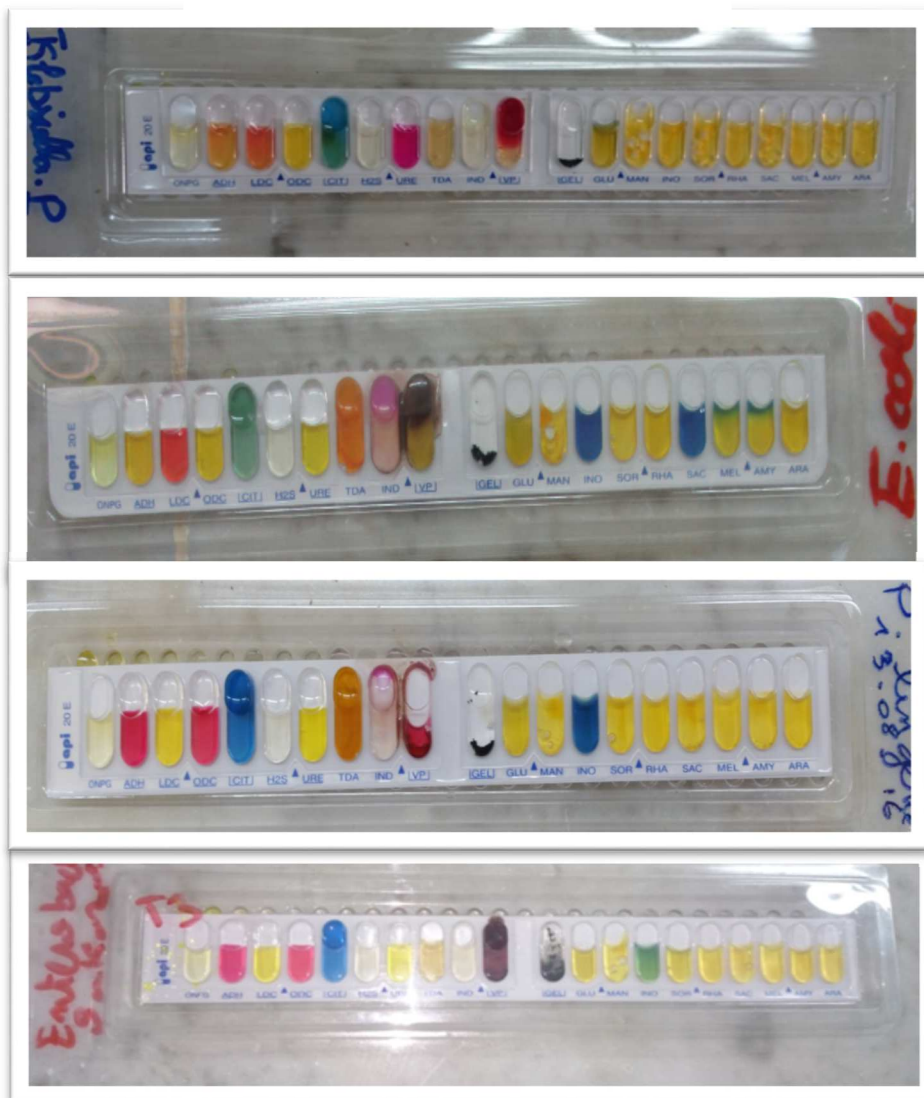


Figure 29 : Résultat de l'identification avec système API 20 E pour les EBGN f (souches de surfaces)

Résultats et Discussion

3-3- Résultat de l'antibiogramme :

La même liste des antibiotiques pour les BGN est testée sur ces germes (les β -lactamines), les résultats sont présentés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Résultats de l'antibiogramme des souches isolées des surfaces.

Germe identifié	Amc	Cz	Cro	Etp	Ctx	Amp	Fox
<i>Citrobacter koseri</i> BLSE	R	R	R	S	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE	I	R	R	S	R	R	S
<i>Enterrobacter sakazaki</i> BLSE	R	R	R	S	R	R	R
<i>Klebsiella.pneumoniae</i> BLSE	S	R	R	S	R	R	S

S: sensible R: resistant I: intermediaire

Tout ces souches isolées sont des entérobactéries BLSE présentant des résistances aux β -lactamines surtout aux Ctx et Cro qui donne une image de synergie avec l'AMC confirmant le phénomène de BLSE (figure 30) sauf pour le cas de *Kl. P* du site : Lit N° 15 qui ne présente pas d'image de synergie dans l'antibiogramme (figure 31), ces souches présentent aussi une résistance aux Cz.

Le phénomène de BLSE peut se détecter par un test complémentaire de double disque.

Le résultat de la détection du BLSE avec le test double disque de la souche *Kl .p* du site : Lit 15 est positif (figure 32).D'autres souches isolées du surface sont aussi testés (figure 33)

Résultats et Discussion

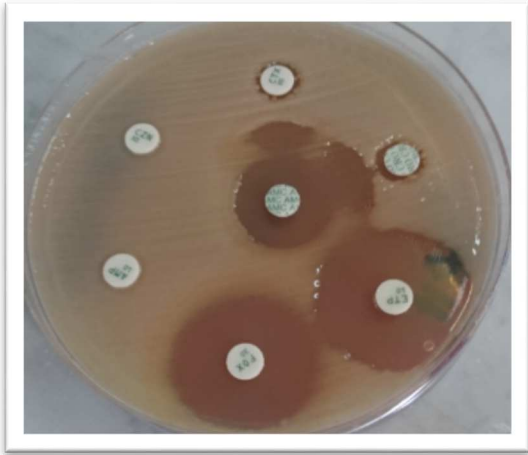


Figure 30 : Antibiogramme BGN f présente une image de synergie

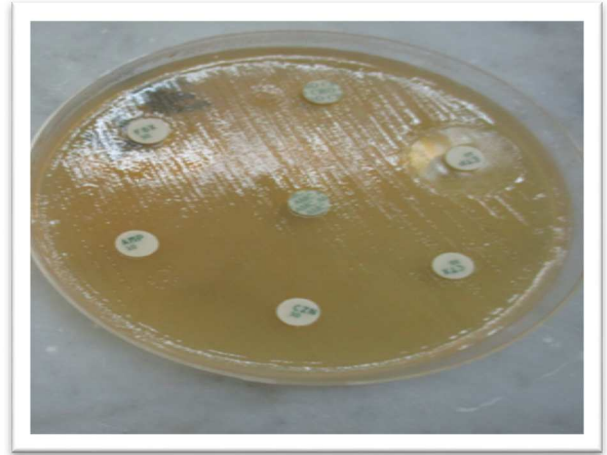


Figure 31 : Antibiogramme d'une *Kl.p* du site lit 15 ne présente pas l'image de synergie

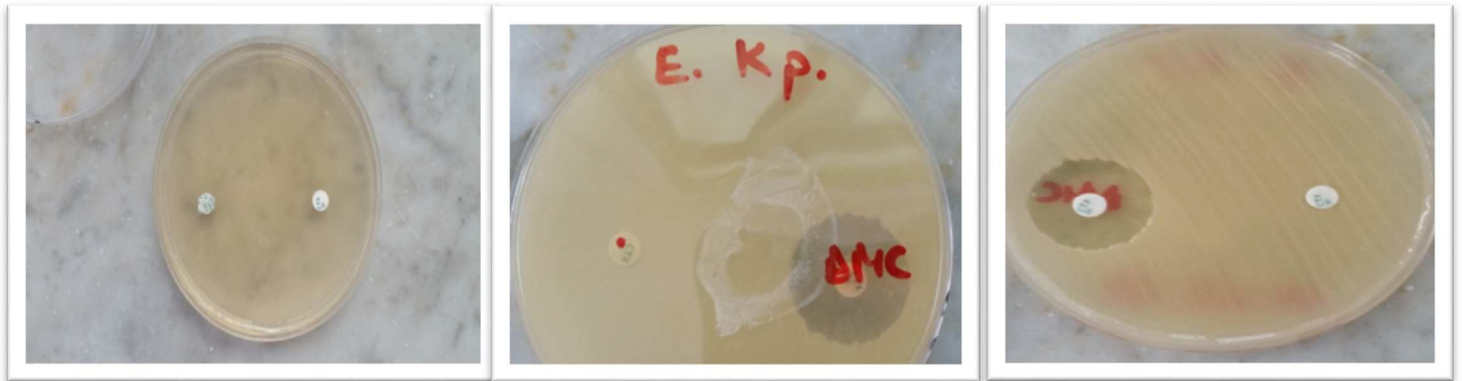


Figure 32: Résultat de test de double disque (Test de synergie) pour *Kl.p* du site lit 15

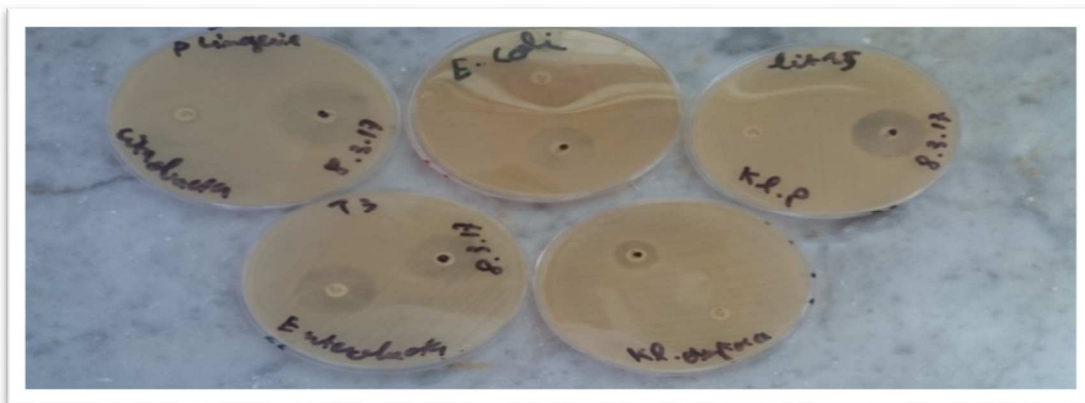


Figure 33 : Résultat de test double disque de confirmation de la présence de BLSE pour d'autres souches

Résultats et Discussion

Répartition de bactéries trouvées sur les surfaces est présentée dans la figure 34.

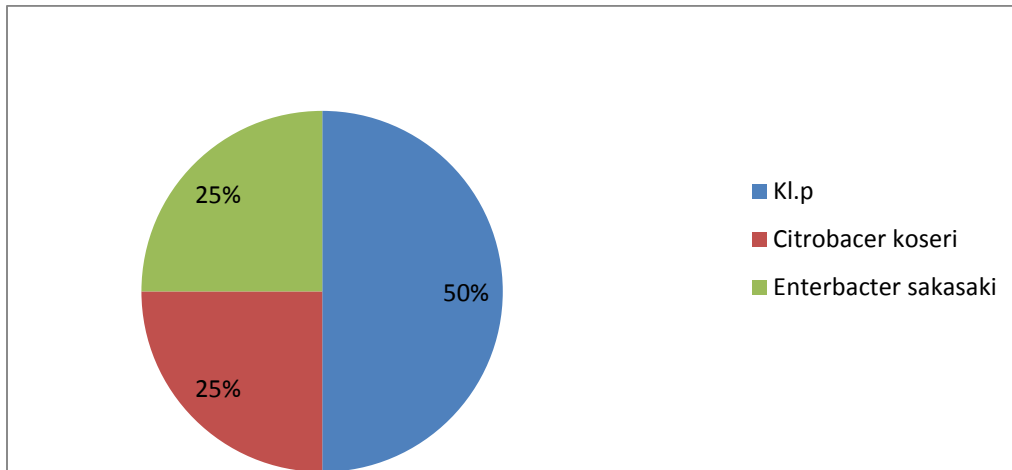


Figure 34 : Répartition des bactéries multi résistantes isolées à partir des surfaces selon leurs fréquences

D'après tout les prélèvements effectués au niveau des 03 services de l'EPH IBN ZOH GUELMA, on peut donner une répartition des différents bactéries résistantes trouvées selon leurs fréquences en espèce trouvés et selon leurs fréquences dans les services (figure 35, 36)

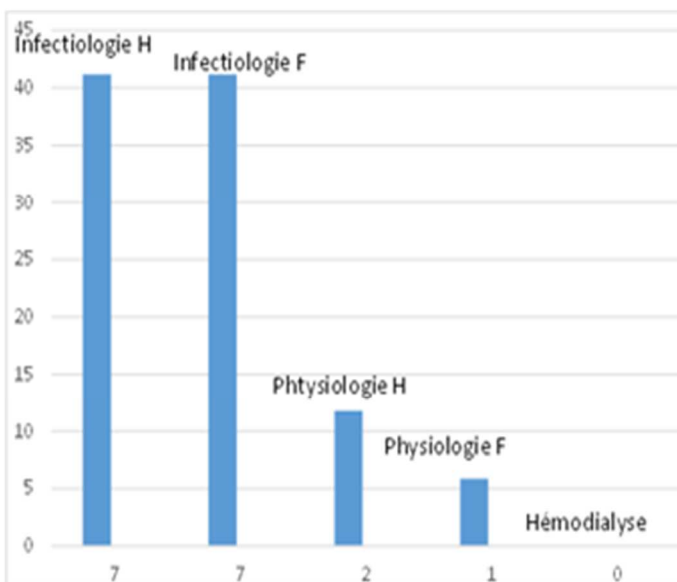


Figure 36: Répartition des services selon la fréquence des bactéries

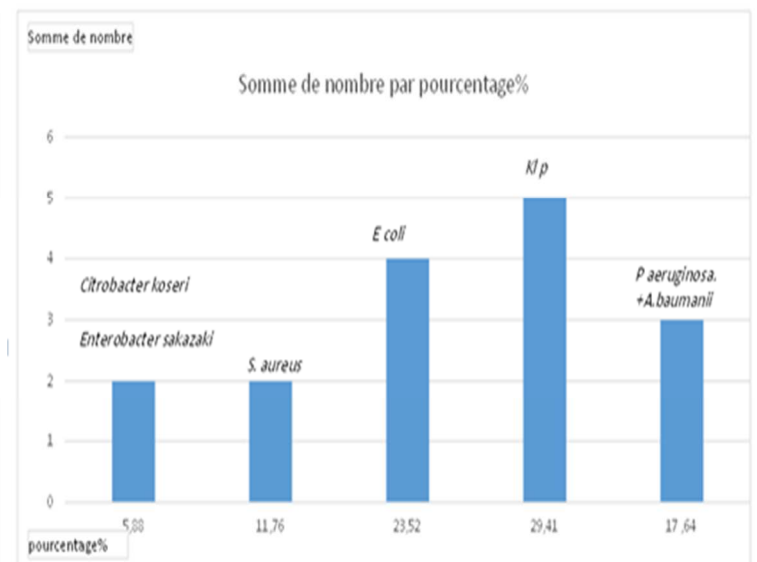
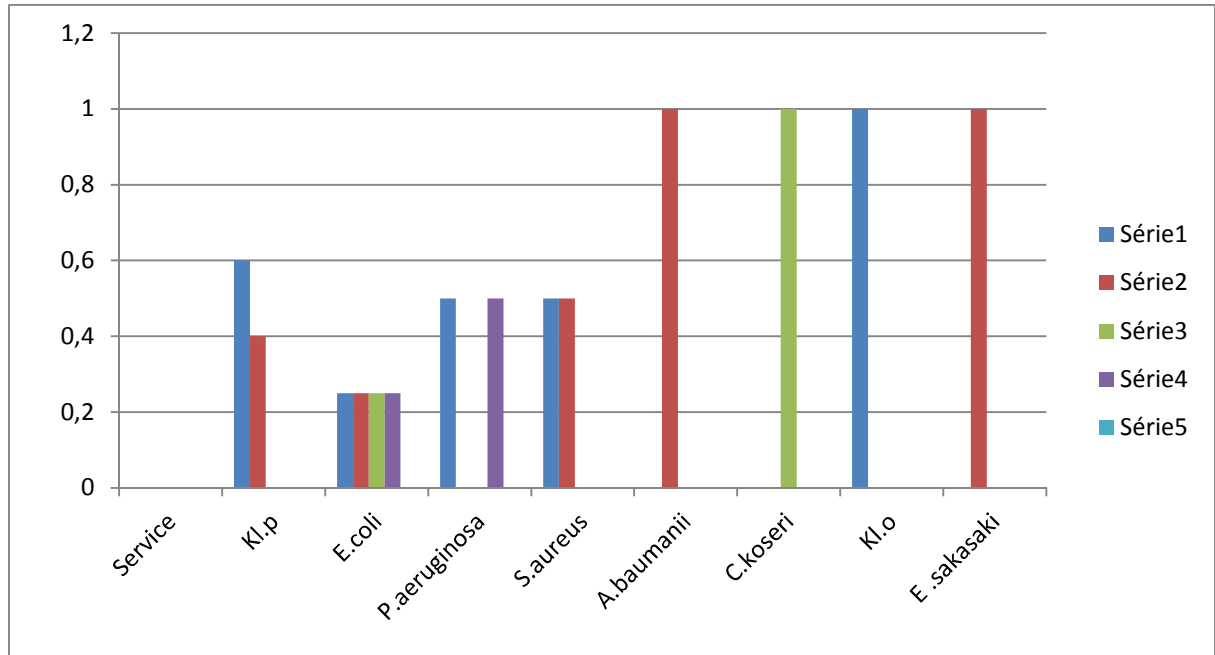


Figure 35 : Répartition de toutes les bactéries isolées selon leurs fréquences

Résultats et Discussion



Serie1 : Inf H –Série 2 :Inf F –Série3 : Pht H–Série4 : Pht F – Série 5 : 2 services

Figure 37 : Répartition des bactéries selon leurs fréquences dans les services

4- Air :

4-1- Observation après culture

4-1-1Macroscopique :

Les boîtes de GN exposés a l’atmosphère des services et leur culture présente un grand mélange de bactéries et de champignons (figure37) où on a rien isolés comme souche bactérienne pure ou bien résistante aux antibiotique.

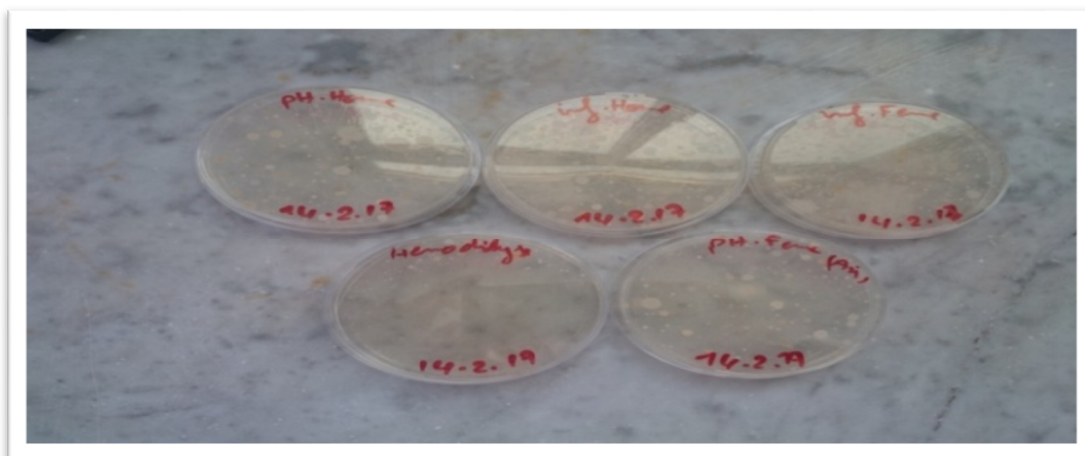


Figure 38: Aspect macroscopique des colonies isolées a partir de l’air

5-Discussion :

Afin d'isoler et d'évaluer la place des bactéries multi résistantes aux antibiotiques responsables des infections nosocomiales dans l'hôpital IBN ZOHR de Guelma, une étude microbiologique a été réalisée au niveau du laboratoire de bactériologie.

Dans cette étude 264 prélèvements différents (urine, pus, air et surface sèche) réalisés pendant une période de plus de 02mois, on a isolé 17 souches multi résistantes avec un pourcentage de 6,44% par rapport à la totalité des bactéries isolées dans notre travail.

Les prélèvements d'urines prennent la première place dans l'isolement de germes résistants à 58,82%, suivi par les prélèvements de surfaces et en dernier ceux du pus 23,53 % et 17,64% respectivement.

Parmi les BMR isolés, on site essentiellement les entérobactéries notamment les bacilles Gram négatif qui sont le plus fréquemment retrouvés dans notre étude à 88,23 % où 58,82% au niveau des urines, 23,52% des surfaces et 5,88% dans le pus. Des résultats semblables ont été trouvés dans des hôpitaux de l'Inde montre aussi cette prédominance des entérobactériacae à 59% (Sahu *et al.*, 2016).

Ces BGN présentent un mécanisme de résistance aux β -lactamines par la production de l'enzyme de β -lactamase à spectre élargi BLSE et pour le *Citrobacter koseri* et *Enterobacter sakazaki* leur présence est faible 5,88% ,d'autre étude montre que les entérobactéries représentent un pourcentage faible de leur fréquence où sur 1153 souches d'entérobactéries, un nombre de 30 souches (2,6 %) étaient productrices d'une BLSE avec 76,6 % de *Klebsellia pneumoniae* 29 souches (2,5 %) produisaient une céphalosporinase, *Escherichia coli*(24,1 %). Ces entérobactéries productrices du BLSE étaient isolées dans les selles des patients (40 %) et dans la trachée (23,3 %), essentiellement dans le service de réanimation chirurgicale dans un hôpital pédiatrique (Mensah, 1997).

Cela est confirmé par des études sur 306 souches de bacilles à Gram négatif (BGN) qui ont été isolées de l'environnement de l'hôpital de Tebessa dont 74,51% des entérobactéries. Les tests de détection des BLSE ont permis de caractériser 114 souches productrices de BLSE, soit 50% des entérobactéries isolées (Debabza, 2015)

Les BMR isolés principalement les BGN étaient les plus fréquemment isolées dans notre étude ce qui est également montré dans l'étude tunisienne (Kolli *et al.*, 2014) et marocaine

Résultats et discussion

(Ben jaballah, 2006), qui montrent que les BGN sont responsables essentiellement des bactériémies (68,2 %) et pneumopathies (31,8%).

Les cocci Gram positif particulièrement les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline SARM étaient rares dans notre étude, on a isolés 02 souches au niveau des pus c'est-à-dire 11,76% par rapport au total de bactéries testées, mais présente le germe majoritaire dans l'étude cyto bactériologique des pus à 66,66%, d'autres résultats montrent aussi la rareté de leur fréquence dans l'unité de néonatalogie (Kolli, 2014), mais au contraire sont fréquemment isolés 76 souches (15 %) étaient résistants à la méticilline et se trouvaient essentiellement dans la trachée (43,4 %) des patients du service de réanimation chirurgicale (47,3 %) (Mensah, 1997).

D'autres études montrent la grande fréquence des *S. aureus* à 58% dans les prélèvements cutanés (78%), hémoculture (9%), prélèvement trachéo-bronchique (4%), uroculture (3%), sonde urinaire (3%), cathéter (3%) au niveau du centre de brûlés de CHU- Annaba (Chaibdraa, 2008). Les SARM sont fréquents aussi dans les unités néonatalogues européennes. (Babazono *et al.*, 2008 ; Jyothi *et al.*, 2013).

Pour les BGN fermentaires, *Klebsiella pneumoniae* était majoritaire de 29, 41% par rapport à *Escherichia coli* 23,53%, ce qui est confirmé par des études algériennes (Abid, 2014).

Par ailleurs *Escherichia coli* était fréquemment isolé en Europe (Biran *et al.*, 2010). Par contre les BGN non fermentaires comme le *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* 17 souches (64%) commence à prendre une place importante dans les infections urinaires nosocomiales c'est-à-dire isolés à partir des patients, comme nous le donne une étude sur 100 souches isolés de *Acinetobacter baumannii*, dont 92 souches étudiés 61 souches a partir des patients et 08 seulement a partir de l'environnement sont résistantes au ATB (Kirkgöz, 2014). Une autre étude est réalisée au niveau de l'hôpital universitaire de Paris où 50 % des germes isolés sont des *Acinetobacter baumannii*, dont 29, 94% sont des souches résistantes (Bergogne *et al.*, 1996).

Un nombre important 20 % des *Pseudomonas aeruginosa* avec 3% seulement de *Acinetobacter baumannii* sont isolés dans le centre de Réanimation et de Traitement des grands brûlés, CHU Annaba (Chaibdraa *et al.*, 2008).

Résultats et discussion

Enfin l'analyse bactériologique de l'air présente un faible pourcentage de germes résistants où on n'a pas isolé aucune souche résistante mais on ne néglige pas la présence de plusieurs types des bactéries sensibles et potentiellement pathogènes.

De nombreux facteurs de risque sont responsables à cette émergence de résistance dont l'utilisation anarchiques des antibiotiques ou à large spectre, la longue hospitalisation et le facteur d'hygiène reste le plus important.

Conclusion

Conclusion :

L'étude microbiologique des prélèvements réalisés au niveau de l'hôpital IBN ZOHR à GUELMA à permet l'isolement et l'identification de bactéries responsables d'infections nosocomiales et par l'étude de leurs antibiogrammes, on a montré que se sont des souches possédants des résistantes multiples aux antibiotiques ce qui pose un grand problème de santé publique.

Notre étude montre la présence dans la plupart des prélèvements étudiés des germes bactériens résistants aux ATB surtout les BGN à 88,23% dont *Klebsiella pneumoniae* à 29,41% et *E.coli* à 23,53% ce qui expose les malades hospitalisés dont l'état physiologique est fragile à ces germes est entraines des surinfections.

La diversité des germes au niveau des trois services occupent une place importante par l'existence des souches multi résistantes « BMR », la contamination du service d'infectiologie 41,17% occupe une place importante. Il faut prendre également en considération les germes sensibles et qui peuvent acquièrent des résistances dans le temps vue leur abondance surtout au niveau des surfaces.

Ces souches pathogènes peuvent être transmises dans l'environnement hospitalier qui peut jouer un rôle important dans leurs propagations s'il ya pas un système de prévention avant l'émergence de ces agents pathogènes ou bien un système de surveillance.

A titre de ce problème, l'importance de la prévention et l'hygiène réglementaire au cours des procédures des soins restent le premier secours pour éviter la contamination de l'environnement hospitalier, l'étude microbiologique reste le premier pilier pour la déclaration de l'existence de ces agents infectieux et enfin un programme de lutte contre l'émergence de BMR est indispensable pour lutter contre les infections nosocomiales.

Résumé :

Notre travail qui a porté sur l'isolement, l'identification et l'étude des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques du milieu hospitalier nous a permis de collecter 17 bactéries multirésistantes aux antibiotiques à partir des prélèvements sur les patients hospitalisés et leurs environnement hospitalier.

Les souches, qui ont été isolées sur des milieux spécifiques puis identifiées par le système d'API20E appartiennent essentiellement à la famille des enterobacteriaceae avec *Klebsiella pneumoniae* en premier rang suivie d'*E. coli*, d'*Enterobacter Spp* et de *Citrobacter koseri* sont principalement résistantes aux β -lactamines. D'autres souches d'enterobactéries non fermentaires ont été isolées et identifiées par le système d'API NE tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Les bactéries Gram positif sont isolées et identifiées par API STAPH sont principalement du *Staphylococcus aureus* résistants aux pénicillines.

Cette étude confirme l'émergence de la résistance aux antibiotiques utilisés en thérapeutique donc un risque de leur propagation dans le milieu hospitalier.

Mots-clés : multi résistance bactérienne, antibiotique, environnement hospitalier, émergence.

Abstract :

Our work that has covered the isolation, identification and the study of an antibiotics resistant bacterial strains in hospital environment, allowed us to collect 17 antibiotics multi-resistant bacteria of hospitalised patients and their hospital environment . The strains that were isolated in specifics middle than identified by the API20E system, belong mainly to the Enterobacteriaceae with *Klebsiella pneumoniae* family in the first rang followed by *Escherichia coli*, *Enterobacter sakasaki* mainly all of them resistant to betalactamine and they are the EBLSE. Other strains of Enterobacteria non fermentation was isolated and identified by the APINE system such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* MRB. The gram positive bacteria isolated and identified by the API STAPH, they are mainly of *Staphylococcus aureus* resistant to meticillines MRSA .This study confirms the emergence of antibiotic resistance used in treatment. Therefore a risk of their spread in the hospital environment.

Keywords : Multi resistant bacteria,-antibiotic- hospital environment- emergence.

ملخص:

إن الدراسة التي قمنا بها تقوم أساسا على عزل وكشف ودراسة انواع البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية في الوسط الصحي

ومن خلال دراستنا حصلنا على 17 نوع من البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية وذلك عبر اخذ عينات من المرضى ومن الوسط الصحي

السلالات التي حصلنا عليها قمنا بالكشف عنها بواسطة النظام API20E الذي يكشف عن العصيات ذات الصبغة السالبة التي تنتمي الى عائلة Enterobacteriaceae منها *Escherichia coli*, *Enterobacter sakasaki* et *Citrobacter koseri* وبنظام APINE تحصلنا على *Pseudomonasa aeruginosa* et *Acinetobacter baumanii* وهذه العينات هي مقاومة لنوع البييتالامين وبنظام APISTAPH تم الكشف عن بكتيريا عنقودية *Staphylococcus aureus* مقاومة لنوع المضادات من عائلة الميتيسيلين.

هذه الدراسة اوضحت تسرب وانتشار السلالات المقاومة للمضادات الحيوية التي تستعمل للعلاج وهذا يعتبر خطر في ازديادها وانتشارها.

الكلمات المفتاحية: متعددة المقاومة- مضاد حيوي- وسط صحي- بروز.

Annexes

Annexes 01 : Composition chimique des milieux de cultures :

1-Gélose au sang cuit (chocolat) :

La formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifiée est :

Peptone tryptique de caséine	7,5
Peptone pepsique de viande.....	7,5
Amidon de maïs	1
Hydrogénophosphate de potassium.....	4
Dihydrogénophosphate de potassium	1
NaCl	5
Hémoglobine	10
Agar.....	15

Ph de milieu= 7,2

2-Gélose au sang frais :

La formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifiée est :

Mélange spécial de peptones.....	23
Amidon.....	1
NaCl	5
Agar.....	10
Sang de mouton.....	50ml
Acidenalidixique.....	0,015
Colistine.....	0,015

Ph de milieu = 7,3

3-Gélose Chapman :

La formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifiée est :

Extrait de viande (bovin porcin)	01
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10
Chlorure de sodium.....	75
DMannitol.....	10
Agar.....	15
Rouge de phénol.....	0.025
Eau distillée.....	1000ml
Protéose peptoneN°3.....	6

Ph de milieu: 7.4

4-Gélose Mac conkey :

La formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifiée est

Peptone de gélatine (bovin ou porcin)	17
Peptone de viande (bovin ou porcin)	3
Lactose (bovin)	10
Sels biliaire (ovin ou bovin).....	1 ,5
Chlorure de sodium	5
Agar	13,5
Rouge neutre	0.03
Cristal violet.....	0,01

Ph de milieu= 7,1

5-Gélose nutritive :

La formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifiée est :

-extrait de viande de bœuf	1
-extrait de levure	2
-peptone.....	5
-Chlorure de sodium.....	5
-Agar.....	15

Ph de milieu= 7,4

6-Gélose Muller Hiton:

Infusion de viande de bœuf	300
Peptone de caséine	17,5
Amidon de maïs	1,5
Agar.....	17

Ph de milieu = 7,4

7-Milieu King A :

La formule type de la gélose King A en g/l d'eau distillée est :

Peptone bactériologique « A »	20
Glycérol	10
K ₂ SO ₄ (anhydre)	10
MgCl ₂ (anhydre).....	1.4
Agar purifié.....	12

Ph de milieu: ± 0.2 à 25°C

8-Milieu King B :

La formule type de la gélose King B en g/l d'eau distillée est :

Peptone bactériologique « B ».....	20
Glycérol.....	10 ml
Hydrogénophosphate de potassium anhydre (K ₂ HPO ₄).....	1.5
Sulfate de magnésium hydraté (MgSO ₄).....	1.5
Agar purifié.....	12

Ph de milieu:7.2±0.2 à 25°C

9-Milieu BGT(bouillon Glucosé tamponné) :

Peptone.....	20
Extrait de viande	2
Glucose	4
Chlorure de sodium.....	2,5
Dihydrogénophosphate de potassium.....	0,7.
Hydrogénophosphate de sodium.....	8,3

Ph de milieu = 7,4

10-Milieu BHIB : (bouillon cœur- cerveau)

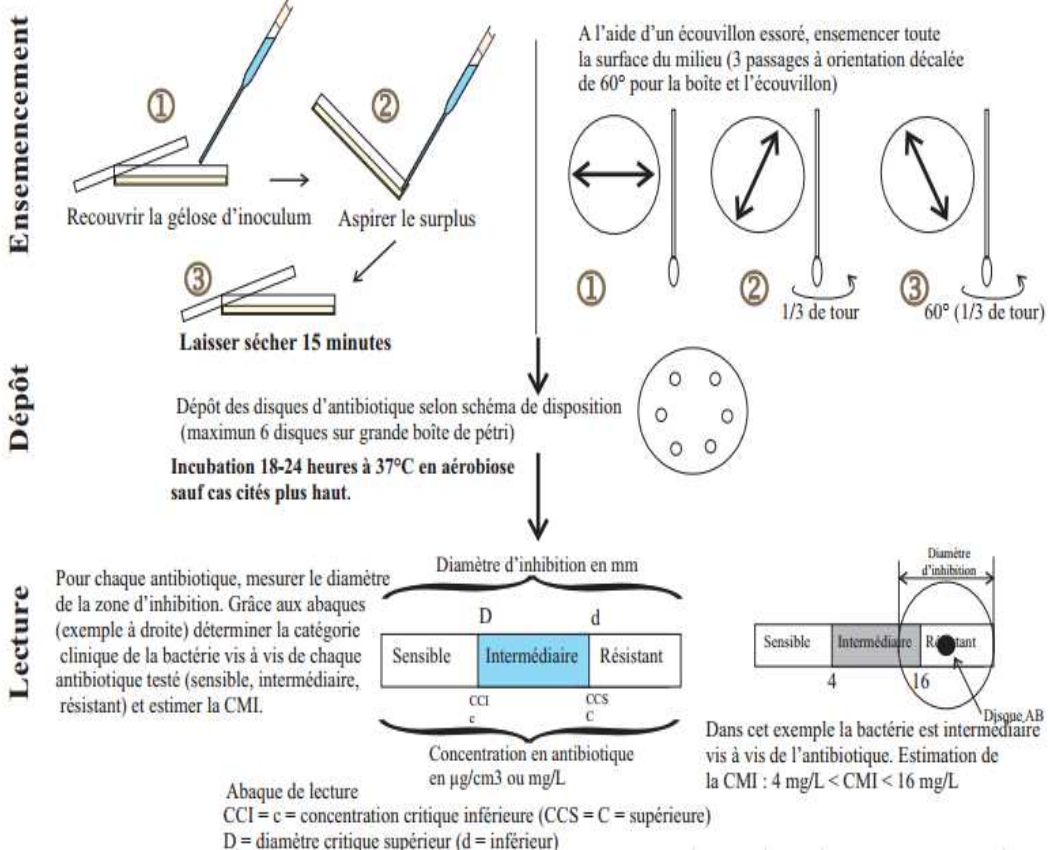
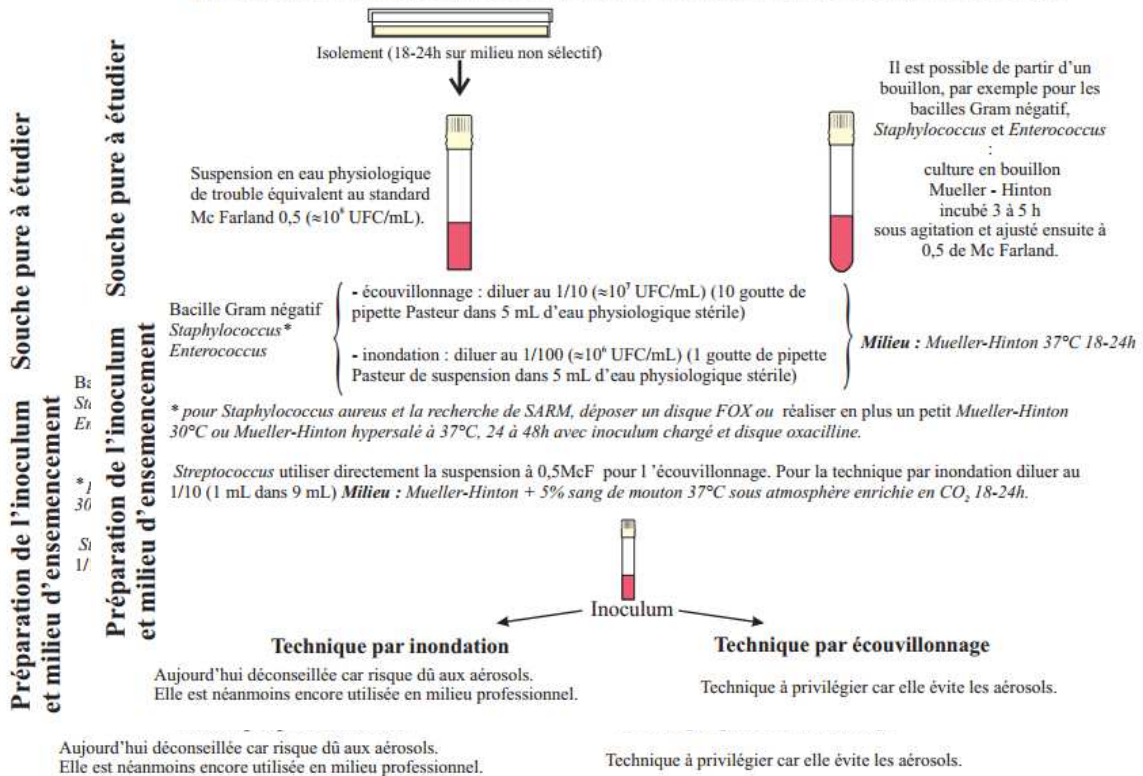
Extrait cœur – cerveau	17,5
Peptone pancréatique de gélatine	10
Chlorure de sodium	5
Phosphate disodique	2.5
Glucose.....	2

PH de milieu =7,4 ± 0,2

Annexe 2 :Antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé

Antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé

par Rémi Moreda d'après l'édition janvier 2010 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.



Références bibliographiques :

- 1-Abid F, Boutefnouchet .N, Dekhil. M, Bouzerna .N. *Klebsiella pneumoniae* productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville de Annaba, Algérie. Scientific study & Research 2007; VII (2) : 199-214.
- 2-Acar. J, baquero . F, Begue.P et Carbon .Les cahiers de l'ICCAAC.Paris ,1997, Pp : 30-34
- 3-Allaouchiche .B, Geissler .A. Infections nosocomiales en réanimation : le point de vue du clinicien. In Freney .Précis de bactériologie clinique, Édition Eska, 2000, P :450-458.
- 4-Avril .J.L, Carlet .J. Les infections nosocomiales et leur prévention. Édition Ellipses, 1998, Pp :679-687 .
- 5-Babazono A, Kitajima H, Nishimaki S, Nakamura T,Shiga S, Hayakawa M, et al. Risk factors for nosocomial infection in the neonatal intensive care unit by the Japanese Nosocomial Infection Surveillance (JANIS). Acta Med Okayama 2008;62:261-8.
- 6- Bathily MD. Sensibilité aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif isolées d'infections urinaires de 1999 à 2001. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako, Mali, 2002, 88p.
- 7-Ben Jaballah N, Bouziri A, Kchaou W, Hamdi A, Mnif K, Belhadj S, Khaldi A, Kazdaghli K. Épidémiologie des infections bactériennes nosocomiales dans une unité de réanimation néonatale et pédiatrique tunisienne. *Médecine et maladies infectieuses* 2006; 36 : 379-38.
- 8-Berche. p, gallard .j. l, simonnet.M. Les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. Bactériologie des infections humaines de la biologie à la clinique. Paris : Flammarion, 1991 : 64-71.
- 9-Bergogne-Bérézin .E. Les infections nosocomiales : nouveaux agents, incidence, prévention. La Presse Médicale du 14 janvier 1995, 24 (2), 89-97.
- 10-Bergogne-Bérézin.E , K. J. Towner^{2*}.*Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological,Clinical, and Epidemiological Features ,1996, p. 148±165,American Society for Microbiology Vol. 9, No. 2
- 11-Bio Merieux SA . Les fiches techniques des systèmes API20E ,APINE et APISTAPH.
- 12-Biran .V, Gaudin .A, Mariani-Kurdjian. P, Doit .C, Bingen .E et Aujard Y. Infections néonatales tardives à entérobactéries multirésistantes. Arch Pediatr 2010;17:150-3.
- 13-Boyce .JM, Potter-Bynoe .G, Chenevert .C, King .T. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : possible infection control implications. Infect Control Hosp Epidemiol ,1997; 18: 622-9
- 14-Bousseboua.H. Éléments de microbiologie : Programme de graduation : biologie,

médecine, pharmacie, chirurgie dentaire, sciences vétérinaires, sciences alimentaires, agronomie. 2^{ème} édition. Edition Campus-Club, 2005, 304p

15-Bouvet .E. Risk for health professionals of infection with human immunodeficiency virus. Current knowledge and developments in preventive Measures. Médecine et Maladies Infectieuses, 1993.

16-Brun-Buisson .Ch. Les infections nosocomiales. Méd. Mal Infect. 1996 ; 26, 53-62

17-Bush. K, Jacoby .GA, Medeiros .AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1211–1233.

18-CA-SFM. AntibioGramme en diffusion. Recommandations techniques et Guide d'interprétation. Communiqué 1998 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sanofi Diagnostics Pasteur, 12p

19-Carbonelle B, Denis F, Marmonier A, Pinon G, Vargues R. Bactériologie médicale, techniques usuelles. Edition SIMEP, France, 1987, 330p.

20-Chaibdraa .A, Bentakouk .MC .Etude bactériologique sur 30 mois dans un service de brûlés, Annals of Burns and Fire Disasters - vol. XXI - n. 1 - March 2008

21-CTIN : Comité Technique national des Infections Nosocomiales. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé : air, eaux et surfaces. Ministère chargé de la santé, 2002; 78p

22-Corvaglia .AR. Rôle des résidus d'antibiotiques dans les environnements hydriques sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *Legionella*. Thèse de doctorat en sciences : Biologie. Université de Genève, 2006, 230p.

23-Debabsa .M .Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire in uiversity badji mokhtar.Thèse de doctorat , 2015 .p : 1 ,8-12

24-Delarras C. Microbiologie. 90 heures de Travaux pratiques. *Gaëtan Morin, France*, 1998, 276p.

25-Delarras.C.Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire.Edition 2008 Pp :128-287

26-Diakite.M. Complications postopératoires en chirurgie urologique réglée.

Thèse de médecine, Bamako, 1996 ; N°19

- 27-**Donlanrm ,Costerton. J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms , Clinical Microbiology Reviews, Vol. 15, No. 2 , April 2002: 167-193
- 28-**Doublet .B. Caractérisation des éléments génétiques mobiles du gène de résistance au florfenicol *floR* chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Thèse de Doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé. Université François Rabelais Tours, France,2004, 107 p
- 29-**Fauchère .JL. Bactériofiches. Techniques en Bactériologie Clinique. Edition Ellipses, 1997, 174p
- 30-**Figarella. J, Leyral .G, Terret .M. Microbiologie générale et appliquée. Collection Sciences et techniques biologiques. Editions Delagrave, 2007, 285p.
- 31-**Fritz. H, Kayser , Erik .C. Bottger , Rolf .M. Zinkernagel , Otto .H , Johannes .E et Peter. D. Microbiologie médicale , 11eme edition , 2008 ,p : 213
- 32-**Gerard .J,Tortora.Introduction à la microbiologie .2eme Edition .Québec.Pearson .Edition du renouveau pédagogique INC, 2011.420-421. P30-
- 33-**Guillaume. PY. Les milieux de culture en microbiologie , 2004
- 34-**Guy .L ,Jean .N. J .Microbiologie technique 2eme édition , Bordeaux , 1998 , p 145, 187
- 35-**Hajjar .H, Hartemann .P, Luu-Duc .D, Nicolle .MC, Perraud. M, Bertrou .A, Cetre .JC, Chapuis .C, Guignement .S et Fabry .J. Vigilance environnementale : Contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier. *HYGIENES* 2000; VIII(3) : 139-179
- 36-**Hall C.B., Douglas R.G. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J. Pediatr*, 1981 ,P :99-100-3.
- 37-**Jarvis .WR. Selected aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost, and prevention. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996 ; 17 : 552-7.
- 38-**Kooli. I, Kadri. Y, Ben Abdallah. H , Mhalla. S , Haddad . O, Noomen. S et Mastouri.M. Épidémiologie des bactéries multi résistantes dans une unité néonatale tunisienne, science direct journal de pédiatrie et de puériculture, 2014 ;27 :236-242
- 39-**Kirkgöz, Yasemin .ZER . Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey in *Turkish Journal of Medical Sciences Turk J Med Sci*, 2014 ;44: 643-648
- 40-**Leclerc .H, Gaillard.JP, Simonet .M. Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien. Edition Doin, Paris, 1995, 535p.
- 41-**Matagne .A, Lamotte-Brasseur .J, Frère. JM. Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J* 1998; 330: 581-598

- 42-**Meyer .A, Deiana .J, Bernard .A. Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2ème édition. Biosciences et techniques, Doin, 2004, 430p
- 43-**Mergoud .L. Etudes bactériologique des bactéries isolés en milieu hospitalier . Mémoire de magister en Microbiologie appliquée de l'université de Badji Mokhtar .Annaba ,2004 Pp : 2-7
- 44-**Michel .P,Drees. Les événements indésirables graves liés aux soins observés dans les établissements de santé : premiers résultats d'une étude nationale. Etudes et Résultats, 2005 ; P398.
- 45-**Mensah. K., Bergeret .M , Lebon. P , Raymond.J. Methicillin-resistant staphylococci and multi resistant enterobacteria isolated in the Saint-Vincent de Paul hospital in Paris, 1997 . maladie infectieuse,journal ISSN : 0399-077X
- 46-**Murthy .R. Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. Chest 2001;119(suppl 2):405-11
- 47-**Nicolle . D, G, Fabry.Prévention des infections nosocomiales, guide pratique, 2^{ème} édition , 2008 ;P : 05- 56- 57-58
- 48-**Ould Brahim Elkory .M. Bacille pyocyanique : identification et sensibilité aux agents antibactériens. Thèse de Magister. Université Badji Mokhtar-Annaba, 1998, 115p
- 49-**Paul .H. Roy. Dissémination de la résistance aux antibiotiques : la génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. médecine/sciences 1997; 13 : 927-33
- 50-**Pechere .J. C , Acar .J , Armengaud. M , Gmeuier .B , Moellering . R. J , Sandem , Walgrogel .F et Zinner . S.Reconnaitre , Comprendre , traiter les infections . 3eme ed Quebec , 1991 ; p : 372
- 51-**Jyothi .P, Metri Basavaraj .C, Peerapur Basavaraj .V. Bacteriological profile of neonatal septicemia and antibiotic susceptibility pattern of the isolates. J Nat Sci Biol Med 2013;4: 306-9.
- 52-**Julie. B. Utilisation raisonnées des antibiotiques en élevage porcin, démarche d'accompagnement dans sept élevages, science vétérinaire, école nationale vétérinaire d'Alfort, 2014 ; p :11
- 53-**Rahal K. Standardisation de l'antibiogramme en Médecine Humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. 4èmeédition, 2005, 95p.
- 54-**Riou . F. Le point sur l'épidémiologie et la prévention des légionelloses en milieu hospitalier. Hygiène S 1993; 3: 22-34.

- 55-**Rouillon .S, Ourdanabia .S, Jamart .S, Hernandez .C et Meunieral .O. Étude de l'efficacité d'un produit détergent désinfectant pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnement hospitalier. *Pathologie Biologie* 2006; 54 : 325-330.
- 56-**Rybak.MJ.Resistance to antimicrobial agents: an update. *Pharmacotherapy* 2004;24(suppl 12):203-15.
- 57-**Sahu MK, Siddharth B, Choudhury A, Vishnubhatla S, Singh SP, MenonR, Kapoor PM, Talwar S, Choudhary S, Airan B .Incidence,microbiological profile of nosocomial infections, and their antibioticresistance patterns in a high volume Cardiac Surgical Intensive CareUnit. *Ann. Card. Anaesth*, (2016) 19:281-287
- 58-**Simonsen GS, Tapsall JW, Allegranzi B, Talbot EA, Lazzari S.The antimicrobial resistance containment and surveillance approach – a public health tool. *Bulletin of World Health Organization* 2004;82:928-34.
- 59-**Stephanie.F. Transfert d'un gene de resistance aux beta-lactamines blaCTX-M-9 entre Salmonella et les enterobacteries de la ore intestinale humaine : inuence d'un traitement antibiotique. *Medication.Universite Rennes 1.French* (2009)
- 60-**Stout .JE, Yu .VL. Legionellosis. *N Engl J Med* 1997; 337 (10): 682-7.
- 61-**Torres .J-M, Andréoletti .O, Lacroux C, Prieto I, Lorenzo P, Larska M, et al. (Sept.2011) Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of H-type prion in homologous prion protein context. *Emerg Infect Dis*
- 62-**Timbine.L.Etude bactériologique des infections nosocomiales dans les services de chirurgie générales, gynécologique, traumatologie, urologie et urgence et réanimation. Thèse de médecine, Bamako, 1998 ; N°6
- 63-**Wilson. ML, G .L.Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients .*Clin Infect Dis* 2004 ; 38 : 1150

Sites web :

1-<http://www.cairn.info/revue-sante-publique-2005-3-page-471.htm>

DOI : 10.3917/spub.053.0471 (24-03-2017)

2-Les infections postopératoire et les niveaux superficielle chirurgicale

<http://ifr48.timone.univ-mrs.fr .Michel.Drancourt@medecine.univ-mrs.fr> (15-04-2017)

3-Risque de diffusion épidémique des BMR

[_http://www.bmsfrance.fr/IMG/pdf/BMS_Guide_Dejets_2008_BD-VF.pd_Low.pdf](http://www.bmsfrance.fr/IMG/pdf/BMS_Guide_Dejets_2008_BD-VF.pd_Low.pdf)

(22-04-2017)

4-Les infections nosocomiales

http://www.invs.sante.fr/publications/2007/enp2006_resultats_preliminaires/enp_2006_resultats_preliminaires.pdf (22-04-2017)

5-les infections nosocomiales, 2006

<http://www.santé.gouv.fr/html/pointsur/nosoco/guide/txt04.html>

6-Organisation mondiale de la santé

http://Ftp.who.int/gb/pdf-Files/WHA_S1/FA9.pdf

Maladies émergentes et autres maladies transmissibles résistances aux antimicrobiens, 1998

(30-04-2017)

7-Maladies émergentes et autres maladies transmissibles résistances aux antimicrobiens, 1998

http://Ftp.who.int/gb/pdf-Files/WHA_S1/FA9.pdf

8-Les modes de transmissions

http://www.utc.fr/~mastermq/public/publications/qualite_et_biomedical/UTC/dess_tbh/99-00/Projets/Infections_Nosocomiales (05-05-2017)

9-(Société française d hygiène hospitalière)

www.sfhf.net (12-05-2017)

10-Les infections nosocomiales : principaux agents responsables, Boye Cs, sow al.

http://microcsb.net/IMG/pdf/Boye_Agents_d_Infections_nosocom_texte_EPU.pdf

(12-05-2017)

11-Les infections nosocomiales : principaux agents responsable

http://microcsb.net/IMG/pdf/Boye_Agents_d_Infections_nosocom_texte_EPU.Pdf (20-05-2015)

12- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell. Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Sixième édition, Elsevier, Churchill Livingstone éditeurs, USA.

Édition en ligne. <http://www.ppidonline.com> (32-04-2017)

13- Agence de santé publique du Canada. Lignes directrices pour l'évaluation de sensibilité des *Enterobacteriaceae* résistants aux antibiotiques à cause des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et le signalement des cas.

<http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ceqa-pceeq/esbl98-fra.php> (22-04-2017)